

Bianca Lucchesi Targhetta

**Desenvolvimento de inoculante alternativo de
Pleurotus ostreatus var. *florida* (Jacq.) P. Kumm. e
Lentinula edodes (Berk.) Pegler por cultivo
submerso**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia e
Biociências da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestra em Biotecnologia e
Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Targhetta, Bianca Lucchesi

Desenvolvimento de inoculante alternativo de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Jacq.) P. Kumm. e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler por cultivo submerso / Bianca Lucchesi Targhetta ; orientador, Márcio José Rossi - Florianópolis, SC, 2015.

137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. fungos comestíveis. 3. bioprocesso. 4. biorreator airlift. 5. microbiologia. I. Rossi, Márcio José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Desenvolvimento de inoculante alternativo de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*
(Jacq.) P. Kumm. e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler por cultivo submerso"**

Por

Bianca Lucchesi Targhetta


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (001/BTC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:




Dr(a) Márcio José Rossi (MIP/CCB/UFSC)

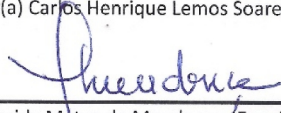
Banca examinadora:



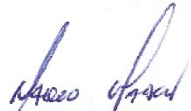
Dr(a) Ceci Sales da Gama Campos (INPA)



Dr(a) Carlos Henrique Lemos Soares (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Margarida Matos de Mendonça (Fungi Brasilis e Verduras Verdes)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

Àqueles que não deixaram de
acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. Em especial à minha mãe, Patrícia, por estar ao meu lado durante esta jornada. Sem seu apoio nada seria possível.

Ao Prof. Márcio, pela orientação e insistência em sempre buscar o inovador, tornando este trabalho possível.

À Prof.^a Margarida, por tão gentilmente ceder o material para a realização deste trabalho.

À Carla Maísa, pela parceria nas análises, pelas sugestões valiosas e pelo apoio quando necessário.

Ao Prof. Carlos Soares e à Tatiana Piñeda, por me receberem no laboratório para a realização das análises enzimáticas e pela paciência em esclarecer todas as dúvidas que surgiram.

Aos membros da banca, que tão gentilmente aceitaram ler e avaliar este trabalho.

Aos valiosos estagiários e agora amigos Jefferson, Kelly, Marina e Mateus, pela ajuda na realização dos experimentos, pela companhia, pelo carinho e pela amizade. A colaboração de vocês para este trabalho é inestimável.

Aos colegas e professores do DMS, aos amigos Andressa, Antônio, Emanuela, Kelly, Rafael, Santuza e Tábata, pela companhia e momentos compartilhados. Em especial à Anabel e Ana Carolina, pela força nos últimos meses.

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação pelos dois anos de convivência.

À Carmem e à Manoela, pela paciência e competência com as quais tratam minha saúde física.

Aos demais amigos, por tudo.

*I know I was born and I know that I'll
die. The in between is mine. I am mine.
Eddie Vedder*

RESUMO

O mercado de cogumelos comestíveis se expande rapidamente, demandando um aumento na sua produção. Para isso, é fundamental o fornecimento de inoculantes de qualidade, que na falta representa um gargalo importante na produção. Os grãos de cereais utilizados tradicionalmente na produção de inoculantes, fornecem nutrientes para o crescimento miceliano do fungo e o prepara para a rápida colonização do substrato. Esses são produzidos usando-se resíduos agrícolas, reciclando-se assim o material lignocelulósico. Alguns fungos comestíveis estão entre os únicos organismos capazes de degradar lignina, transformando-a em biomassa de valor nutricional. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma alternativa biotecnológica para o processo de fermentação em estado sólido, tradicionalmente utilizado na produção dos inoculantes. Um inoculante em alginato de cálcio foi desenvolvido utilizando o processo de fermentação submersa com aditivos nutrientes a fim de simular as condições do inoculante em grãos, induzindo a produção de enzimas lignocelulolíticas (peroxidases e β -glicosidasas). Foi possível cultivar *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* var. *florida* em condições submersas com aeração em frascos estáticos utilizando farinha de trigo integral e serragem de eucalipto como aditivos e a biomassa obtida foi encapsulada em alginato de cálcio. Os inoculantes em alginato aditivados de *L. edodes* colonizaram o substrato mais rapidamente do que o inoculante em alginato não aditivado, mas não foram observadas diferenças de colonização entre os inoculantes em alginato de *P. ostreatus* var. *florida*. A viabilidade dos inoculantes em alginato foi mantida em 100 % por pelo menos seis meses, ultrapassando em quatro meses a viabilidade dos inoculantes tradicionais. Um biorreator *airlift* foi utilizado com sucesso no cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* utilizando farelo de trigo como aditivo. Uma grande quantidade de biomassa foi obtida, assim como uma pequena produção de exopolissacarídeos. Atividade para as duas enzimas estudadas foi detectada. Este trabalho possibilitou a produção de um inoculante em alginato de cálcio de qualidade em menor tempo que o inoculante tradicional, com alta viabilidade, utilizando aditivos para preparar o metabolismo fúngico e com grande potencial para produção e uso comercial. O uso de um biorreator *airlift* se mostrou eficiente na produção de quantidades desejáveis de biomassa para a produção de inoculante.

Keywords: shiitake, cogumelo ostra, inoculante, fermentação submersa, enzimas lignocelulolíticas.

ABSTRACT

The edible mushroom market is expanding rapidly, demanding an increased production. Ergo, it is necessary a regular supply of high quality grain spawn, making it the bottleneck of the process. The cereal grains used in spawn making provide nutrients for mycelium growth and prepare the fungus for the rapid colonization of the substrate. Mushrooms are grown on agro industrial residues, thus recycling the lignocellulosic materials. Some edible mushrooms are amongst the only organisms capable of degrading lignin, transforming this recalcitrant material in a valuable biomass. The aim of this work was to develop a biotechnological alternative to the solid-state fermentation, traditionally used to produce spawn. An alginate-based inoculant was developed using submerged fermentation using additives so to mimic the conditions in the grain spawn, inducing the fungi to produce lignocellulolytic enzymes, namely peroxidases and β -glucosidases. It was possible to grow both *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* var. *florida* in submerged conditions provided with aeration in static flasks using whole-wheat flour and eucalypt sawdust as additives. The biomass obtained was encapsulated in calcium alginate. The alginate-based inoculants were capable of colonizing the substrate for mushroom production. *L. edodes* additivated alginate inoculants colonized the substrate faster than the non-additivated alginate inoculant, but no differences in colonization were observed between *P. ostreatus* var. *florida* alginate inoculants. The inoculants maintained a 100 % viability for at least six months, surpassing in four months that for the traditional grain spawn. An airlift bioreactor was used to successfully cultivate *P. ostreatus* var. *florida* using wheat bran as additive. A high yield of biomass was obtained as well as a small production of exopolysaccharides. Activity for both enzymes studied was detected. This work made possible to produce an alginate inoculant of quality in less time than the grain spawn, with high viability, using additives to prepare the fungus metabolism with great potential for production and commercial use. The use of an airlift bioreactor proved to be efficient in producing desirable amounts of biomass for inoculant production.

Keywords: shiitake, oyster mushroom, spawn, submerged fermentation, lignocellulolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Complexidade de substratos <i>versus</i> utilização por organismos	28
Figura 2	Diferentes tipos de inoculante: A) serragem, B) grãos, C) lascas, D) cavilhas	31
Figura 3	Biorreatores pneumáticos: coluna de bolhas (a), <i>airlift</i> com circulação interna (b) e <i>airlift</i> com circulação externa. O gráfico representa as faixas de operação entre os dois conceitos com relação a velocidade do gás (U_G) e a velocidade de circulação de líquido (U_{Lr})	39
Figura 4	Procedimento para encapsulamento de biomassa fúngica em gel de alginato de cálcio	45
Figura 5	Biorreator <i>airlift</i> de 5 L com circulação interna	49
Figura 6	Cultivo aerado de <i>L. edodes</i> em condição submersa em meio MNM com adição de farinha de trigo e meio MNM sem adição de farinha de trigo	59
Figura 7	Micélio de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> crescido em meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubado em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	63
Figura 8	Concentração de proteínas totais de <i>L. edodes</i> e <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições	64
Figura 9	Atividade enzimática de β -glicosidase de <i>L. edodes</i> e <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições	64
Figura 10	Atividade enzimática de peroxidases de <i>L. edodes</i> e <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições	65
Figura 11	Gráfico das médias de concentração de β -glicosidase ($\mu\text{mol/L}$) de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	70

Figura 12	Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de β -glicosidase de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	70
Figura 13	Gráfico das médias de concentração de peroxidases (mmol/L), de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	71
Figura 14	Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de peroxidases de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	71
Figura 15	Gráfico das médias de concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	72
Figura 16	Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de proteínas de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias	72
Figura 17	Crescimento linear do micélio de <i>L. edodes</i> em substrato de produção de cogumelos inoculado com o inoculante tradicional e com o inoculante em alginato, incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 50 dias	74
Figura 18	Crescimento miceliano linear de <i>L. edodes</i> em substrato de produção de cogumelos inoculado com inoculante tradicional e com inoculante em alginato no 28º dia (A), incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 50 dias. Comparação da aparência do micélio produzido pelo inoculante em alginato e inoculante tradicional (B)	75
Figura 19	Crescimento miceliano linear de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , a partir de inoculantes em alginato produzidos	77

	em três meios de cultura diferentes, em substrato de produção de cogumelos, incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 21 dias	
Figura 20	Colonização do substrato de produção de cogumelos pelos diferentes inoculantes em alginato de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> , incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 21 dias. Superfície do substrato ao 2º dia (A); 8º dia (B); 12º dia (C); colonização completa (D)	78
Figura 21	Formação de primórdios e frutificação de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em laboratório, mantidas em sala iluminada a 22 °C. Primórdios ao 36º dia após a inoculação (A) e (B); Frutificações no 41º dia após a inoculação (C) e (D)	79
Figura 22	Superfície do substrato de produção de cogumelos parcialmente colonizada pelo inoculante em alginato de <i>L. edodes</i> produzido em meio MNM+serragem ao 12º dia, incubado em estufa a 25 ± 1 °C	80
Figura 23	Crescimento miceliano linear em substrato de produção de cogumelos por inoculantes em alginato de <i>L. edodes</i> produzidos em três meios de cultura diferentes, incubados em estufa a 25 ± 1 °C, por 60 dias	80
Figura 24	Colonização do substrato de produção de cogumelos pelos diferentes inoculantes em alginato de <i>L. edodes</i> , ao 43º dia (A) e ao 60º dia (B), incubados em estufa a 25 ± 1 °C	82
Figura 25	Viabilidade em relação ao tempo de armazenamento, sob refrigeração, de inoculantes de <i>L. edodes</i> produzidos em meio MNM suplementado ou não com farinha de trigo	85
Figura 26	Viabilidade em relação ao tempo de armazenamento, sob refrigeração, de inoculantes em alginato de <i>L. edodes</i> produzidos em três meios de cultura diferentes	88
Figura 27	<i>Holdup</i> do gás em função da vazão específica de ar na entrada do biorreator	89
Figura 28	Velocidade de circulação de líquido e <i>holdup</i> do gás em função da velocidade superficial do gás (U_G)	90
Figura 29	Determinação do tempo de mistura através de pulso de água quente no topo do biorreator operado como coluna de bolhas. Vazão específica de ar de 0,4 vvm (a) e 1,0 vvm (b)	91

Figura 30	Determinação do tempo de mistura através de pulso de água quente no topo do biorreator operado como <i>airlift</i> com circulação interna. Vazão específica de ar de 0,4 vvm (a) e 1,0 vvm (b)	92
Figura 31	Biorreator em teste: ensaios dinâmicos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). CO ₂ sendo injetado para remoção do oxigênio	93
Figura 32	Valores de oxigênio dissolvido em função do tempo, obtidos através de ensaio dinâmico para determinação do k_{La} . Biorreator operado na vazão específica de 0,6 vvm (3,0 L _{ar} /min)	94
Figura 33	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em função da vazão específica de ar	95
Figura 34	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em função do <i>holdup</i> do gás. As linhas tracejadas mostram a tendência dos valores considerando uma separação adequada do gás no topo do biorreator	96
Figura 35	Concentração de enzimas, proteínas e biomassa ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	99
Figura 36	Produção de biomassa e EPS, valores de pH e consumo de glicose ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	100
Figura 37	Determinação da conversão de glicose em biomassa para o cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	103
Figura 38	Acúmulo de biomassa no visor superior do biorreator <i>airlift</i> ao 7º dia de cultivo (A), e na base do <i>riser</i> quando da desmontagem do biorreator (B)	104
Figura 39	Determinação da velocidade específica de crescimento média para o cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	104
Figura 40	Determinação da velocidade específica de produção de proteínas para o cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	105
Figura 41	Unidades de β -glicosidase e peroxidases produzidas ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	106

Figura 42	Quantidade de proteínas e biomassa produzidas ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	106
Figura 43	Valores para o rendimento de proteínas (Pr), β -glicosidase (G) e peroxidases (Pe) em relação à biomassa (X) produzida ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamento experimental 2 ³ com os níveis reais e codificados das variáveis.	47
Tabela 2	Dados de projeto utilizados na construção do biorreator <i>airlift</i>	50
Tabela 3	Valores de $Y_{X/S}$ (g _x /g _s) obtidos para cultivos em frascos aerados após 15 dias (média de duas repetições).	60
Tabela 4	Concentração de β -glicosidase, peroxidases e proteínas totais em função do pH e concentrações iniciais de farelo de trigo e fonte de N ((NH ₄) ₂ HPO ₄), após 20 dias de cultivo em frascos estáticos em BOD a 25 °C	66
Tabela 5	Comparação dos parâmetros hidrodinâmicos de diversos trabalhos obtidos para diferentes biorreatores, para uma velocidade de gás (U_g) igual a 0,02 m/s (ROSSI, 2006).	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FES	fermentação em estado sólido
EPS	exopolissacarídeo(s)
ONG	Organização não governamental
C:N	relação carbono nitrogênio
v:v	volume por volume
FSm	fermentação submersa
LBP	Laboratório de Bioprocessos
STR	reator de tanque agitado
BDA	Batata Ágar Dextrose
g	grama
L	litro
MNM	meio Melin-Norkrans modificado
mL	mililitro
µg	micrograma
rpm	rotações por minuto
s	segundo
PVC	Policloreto de vinila
®	marca registrada
µm	micrômetro
m:v	relação massa volume
nm	nanômetro
UI	Unidade Internacional
µmol	micromol
mmol	milimol
nm	nanômetro
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
PTFE	politetrafluoretileno
Ø	diâmetro
mm	milímetro
OD	oxigênio dissolvido
cm	centímetro
atm	atmosfera
D	diâmetro interno do <i>riser</i>
H	altura do <i>riser</i>
H/D	razão altura/diâmetro
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
min	minuto
V _E	aumento do volume de líquido pela expansão do gás
V _D	volume da dispersão gás-líquido

ε	<i>holdup</i> do gás
\bar{U}_{Lc}	velocidade média de circulação
x_C	distância percorrida por um traçador durante uma circulação completa
t_c	tempo médio para uma circulação completa
U_{Ld}	velocidade do líquido no <i>downcomer</i>
U_{Lr}	velocidade do líquido no <i>riser</i>
A_r	área da seção transversal do <i>riser</i>
A_d	área da seção transversal do <i>downcomer</i>
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
V_r	volume do <i>riser</i>
V_d	volume do <i>downcomer</i>
t	tempo
C	concentração de oxigênio dissolvido
C_s	concentração de oxigênio dissolvido na saturação
z	constante da vazão de operação
g	aceleração devido à gravidade
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
X	concentração de biomassa
S	concentração de substrato
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em biomassa
μ_X	velocidade específica de crescimento celular
OUR	velocidade específica de consumo de oxigênio pelas células
μ_{Xmax}	velocidade específica máxima de crescimento
t_{dup}	tempo para duplicação da biomassa
X_f	concentração final de biomassa
S_f	concentração de glicose residual
Δ	diferença entre duas variáveis
U_G	velocidade superficial do gás

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 REVISÃO DA LITERATURA	30
3.1 COGUMELOS COMESTÍVEIS	30
3.1.1 Polissacarídeos fúngicos	32
3.1.2 Resíduos agrícolas e a produção de cogumelos	33
3.1.3 Enzimas lignocelulolíticas	35
3.1.4 Substratos para produção de cogumelos	37
3.2 <i>SPAWN</i>	38
3.2.1 Produção de inoculante	39
3.2.2 Fermentação submersa	41
3.2.3 Imobilização em hidrogel de alginato	43
3.3 BIORREATORES	44
3.3.1 Biorreatores para cultivo de fungos filamentosos	46
3.3.2 Hidrodinâmica gás-líquido	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Isolados fúngicos	50
4.2 Manutenção das culturas	50
4.3 Meio de cultura para cultivo submerso	51
4.4 Preparo do inóculo de cultivo	51
4.5 Cultivo em frascos aerados	51
4.5.1 Aditivos nutrientes	52
4.5.2 Encapsulamento da biomassa em hidrogel	52
4.5.3 Testes de viabilidade dos inoculantes	54
4.6 Avaliação da atividade de enzimas lignocelulolíticas	54
4.7 Estimulação da produção de enzimas lignocelulolíticas	55
4.8 Colonização do substrato de produção de cogumelos	55
4.8.1 Comparação da colonização do substrato pelos diferentes inoculantes em alginato	56
4.9 Construção do biorreator	56
4.9.1 Estudos hidrodinâmicos	59
4.9.2 <i>Holdup</i> do gás	59
4.9.3 Velocidade de circulação de líquido	59
4.9.4 Tempo de mistura	60
4.9.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	61
4.10 Cultivo em biorreator	62
4.10.1 Determinações analíticas	63

4.10.2 Determinação das grandezas de transformação	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Cultivos preliminares em frascos aerados	66
5.1.1 Determinação da conversão de substrato em biomassa	68
5.2 Atividade de enzimas lignocelulolíticas	70
5.3 Estimulação da produção de enzimas lignocelulolíticas em <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	73
5.4 Colonização do substrato de produção de cogumelos	81
5.4.2 Comparação da colonização do substrato pelos diferentes inoculantes em alginato	83
5.5 Viabilidade dos inoculantes em alginato em relação ao tempo de armazenamento	92
5.5.1 Estudos preliminares	92
5.5.2 Viabilidade dos diferentes inoculantes em alginato	93
5.6 Caracterização hidrodinâmica do biorreator	96
5.6.1 <i>Holdup</i> do gás e velocidade de circulação de líquido	96
5.6.2 Tempo de mistura	98
5.6.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	101
5.7 Produção de biomassa e EPS em biorreator operado em modo <i>airlift</i>	107
6 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE A – Tabela dos valores obtidos para proteínas, biomassa, glicose, pH e EPS ao longo do cultivo de <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> em biorreator <i>airlift</i>.	135
APÊNDICE B – Tabela dos valores obtidos para concentrações e UI de β-glicosidase e peroxidase ao longo do cultivo de <i>shimeji</i> em biorreator <i>airlift</i>.	137

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são fungos conhecidos pela humanidade desde a antiguidade, sendo utilizados como alimentos e medicamentos. A produção mundial de cogumelos comestíveis é estimada em dez milhões de toneladas anualmente (FAO, 2015). No Brasil, a produção é de cinco mil toneladas com dados estimados somente pelo consumo do produto fresco na região sudeste, onde se concentra o maior volume de produção e consumo (MODA, 2003). De acordo com Chang e Miles (2004) os cinco cogumelos mais cultivados mundialmente são: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Flammulina velutipes* e *Volvvariella volvacea*. Os cogumelos são apreciados não apenas pela sua textura e paladar, mas também por suas propriedades nutricionais e medicinais. Dentre os gêneros mais apreciados estão *Agaricus*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Grifola*, *Hericium*, *Lentinula*, *Pleurotus* e *Tremella* (CHANG, 1996).

O cultivo de cogumelos é uma das alternativas mais eficientes para a utilização de resíduos agroindustriais, convertendo-os em alimentos de alto valor nutricional. Além disso, vários autores vêm realizando estudos acerca das propriedades medicinais conferidas a diferentes compostos presentes em cogumelos, especialmente os exopolissacarídeos (EPS) (ALEXANDRE et al., 2004; POUCHERET et al., 2006). As β -glucanas de *Agaricus subrufescens* são usadas na profilaxia do câncer e como carcinostático (EGUCHI et al., 1999). Enzimas antioxidantes já foram encontradas em *L. edodes*, além da β -glucana lentinano, com comprovada ação redutora do colesterol e câncer. Outros compostos com ação antifúngica e antibacteriana também já foram relatados (POUCHERET et al., 2006; GHORAI et al., 2009). *Pleurotus ostreatus* é considerado promissor como cogumelo medicinal, exibindo atividade antiviral, antitumoral, antibiótica, de redução do colesterol e imunomoduladora (GHORAI et al., 2009). Além disso, tem grande concentração de compostos antioxidantes, como vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos (POUCHERET et al., 2006).

Os substratos utilizados para produção de cogumelos podem requerer pré-tratamentos para tornar os constituintes químicos mais acessíveis e sua estrutura física mais suscetível à penetração do micélio (MUDGETT, 1986). Na forma tradicional, os cogumelos são produzidos em materiais residuais pasteurizados. A inoculação do substrato se dá pela introdução do inoculante, que é um material sólido enriquecido com micélio fúngico (ROYSE, 2002). O método tradicional de cultivo para produção do inoculante é em sistema FES (fermentação em estado

sólido), iniciado pela inoculação de micélio viável do fungo previamente isolado em condições assépticas. Após o crescimento, faz-se a transferência do micélio (matriz primária) para o grão de cereal ou para serragem enriquecida. As principais funções dos grãos são fornecer os nutrientes essenciais para o desenvolvimento do fungo e servir como veículo de dispersão do micélio (EIRA e MINHONI, 1997). A inoculação deve propiciar uma colonização rápida do substrato, para que oportunistas e competidores não se utilizem do fator nutricional residual dos grãos, e do próprio substrato, e ali se estabeleçam prejudicando a produção. No entanto, esse sistema FES tem limitações quanto à transferência de calor e massa, homogeneização, controle de pH e temperatura, entre outras (ROSSI et al., 2007).

Um processo mais elaborado para a produção de inoculantes fúngicos consiste no cultivo em meio líquido em biorreator com posterior encapsulamento do micélio em hidrogel (ROSSI, 2006). Essa técnica, quando comparada ao sistema FES, apresenta vantagens como a fácil mistura do meio de cultivo, permitindo a homogeneidade da cultura e rápida modificação de condições de cultivo como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, velocidade de agitação e concentração de nutrientes (WALTER e PAAU, 1993). O processo pode ser realizado em menor espaço e também em um período mais curto de tempo, pois no biorreator a transferência de massa é otimizada, permitindo uma utilização mais eficiente dos nutrientes (ROSSI et al., 2002).

Apesar das dificuldades relacionadas ao processo FES, a qualidade, em termos de potencial de inóculo, é elevada, porém com um tempo de viabilidade e armazenamento baixo. Quando o inoculante é inoculado no substrato, o grão continua a fornecer nutrientes até que o micélio se adapte ao novo substrato (BRUM, 2005). O inoculante produzido em biorreator e encapsulado em hidrogel, ao contrário, é constituído apenas de micélio fragmentado. Dessa forma, quando inoculado no substrato lignocelulósico, o retardo necessário para sua adaptação e início do desenvolvimento pode ser crucial para a colonização adequada do substrato. Esse atraso na colonização pode levar a um aumento nas perdas na produção devido à contaminação por fungos oportunistas.

Neste contexto, esse trabalho pretendeu desenvolver um processo de cultivo submerso eficiente em biorreator, seguido da imobilização do fungo em hidrogel com inserção de cargas como aditivos nutricionais, de modo a constituir um inoculante com capacidade de colonizar o substrato e viabilidade ao longo do tempo de armazenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- a) Desenvolver um inoculante baseado em processo fermentativo submerso com imobilização em hidrogel de alginato aditivado.
- b) Caracterizar o processo de produção deste inoculante.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar a produção de biomassa em cultivo submerso com aeração forçada e a utilização de aditivos nutrientes;
- b) Avaliar a viabilidade dos inoculantes de alginato em relação ao tempo de armazenamento;
- c) Verificar a colonização do substrato pelo inoculante em hidrogel e comparar com o inoculante produzido em grãos de cereais;
- d) Avaliar a colonização do substrato pelos inoculantes produzidos com aditivos nutrientes;
- e) Desenvolver e caracterizar a hidrodinâmica de um biorreator para cultivo submerso de fungos;
- f) Estudar a cinética de crescimento do fungo e produção de EPS em biorreator.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COGUMELOS COMESTÍVEIS

Cogumelos são os corpos de frutificação de alguns tipos de fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, relacionados com o ciclo de reprodução sexuada. A produção de cogumelos comestíveis é um mercado em crescente expansão em todo o mundo. Com a estimativa de produção mundial em quase 10 milhões de toneladas entre 2012 e 2013, a Ásia é responsável por 75 % de sua produção e tem a China à frente como a maior produtora mundial, com mais de 70 %, totalizando mais de 5 milhões de toneladas. O restante da produção é dividido entre Itália, Estados Unidos e Holanda. Como dominante da produção mundial, a China também acaba sendo a grande exportadora de cogumelos para o mundo (FAO, 2014).

De acordo com os dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o Brasil não aparece nas estimativas, que consideram apenas produções maiores de 5 mil toneladas anuais. Entretanto, segundo informação da ANPC (Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos) (ANPC, 2014) a produção no Brasil está estimada em 12 mil toneladas anuais. É possível que o Brasil não figure entre os produtores no site da FAO por falta de estatísticas oficiais sobre a produção nacional, dificultando a inclusão do país no cenário deste mercado. O cogumelo mais produzido é o *Agaricus bisporus* (8 mil toneladas) seguido por espécies de *Pleurotus* e *Lentinula edodes* (2 mil e 1,5 mil toneladas, respectivamente). Os principais produtores no país estão localizados nos estados de São Paulo e Paraná, apesar da produção estar disseminada por todo o país. A ANPC acredita que exista cerca de 300 produtores, em sua maioria micro e pequenos agricultores, o que dificulta a quantificação exata nas poucas estimativas que existem sobre o setor.

Devido à disparidade entre a produção brasileira e chinesa, o Governo Federal adotou medidas de proteção ao mercado brasileiro, aumentando o imposto de importação dos cogumelos chineses, ajudando a manter a competitividade do produto nacional. Mesmo assim, a importação do produto chinês aumenta a cada ano. Em 2013 foram quase 11 mil toneladas importadas e, até o mês de outubro de 2014, quase 10 mil toneladas foram importadas (AliceWeb, 2014).

O aumento na importação de cogumelos claramente demonstra um aumento no consumo do produto, tanto em conserva quanto *in natura*.

Esse aumento no consumo se deve à popularização do produto, com maior presença nos mercados, o que facilita o acesso aos consumidores. Todavia, o consumo *per capita* no Brasil ainda é de apenas 160 gramas ao ano, valor considerado muito baixo quando comparado a outros países, onde o consumo pode chegar a até 8 kg *per capita* ao ano. O baixo consumo se deve em grande parte aos altos preços praticados pelo mercado, mas também à falta de cultura e conhecimento na utilização de cogumelos, principalmente *in natura*, pelos brasileiros. Essa é uma herança da colonização portuguesa, população considerada micofóbica. A tendência de aumento no consumo mostra que, aos poucos, os brasileiros estão se informando e buscando conhecer o que os cogumelos têm a oferecer.

Consumidos desde os primórdios da civilização, em civilizações antigas como a romana, grega e japonesa eram considerados um alimento divino, capaz de dar força e coragem antes das batalhas e também com poder afrodisíaco e, por isso, seu consumo muitas vezes era restrito à realeza e pessoas nobres. Os chineses também acreditavam que os cogumelos possuíam poderes medicinais e de cura, e até hoje esse é um uso bastante comum (CHANG e BUSWELL, 1996).

Nutricionalmente falando, os cogumelos são alimentos funcionais. Análises das espécies mais cultivadas evidenciam que possuem um altíssimo teor de água, podendo chegar a até 90 % do peso fresco. Tem baixas calorias, um elevado conteúdo proteico, que varia entre 19 a 35 % em peso seco, baixo teor total de gorduras, elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (72 a 85 % do total de ácidos graxos), alto teor de fibras e carboidratos (entre 4 e 20 % em peso seco), além de conterem vitaminas e minerais. Por ser um alimento de origem não animal não contém colesterol, característica que chama a atenção de muitos consumidores que buscam uma dieta mais saudável (CHANG e BUSWELL, 1996; CHANG, 2008).

Além dos feijões, os cogumelos são os únicos alimentos de origem não-animal que contém os nove aminoácidos essenciais à dieta humana, sendo especialmente ricos em lisina e leucina, aminoácidos essenciais que não são encontrados em grande quantidade em cereais básicos, tornando os cogumelos excelentes substitutos da carne para aqueles que seguem uma dieta vegetariana (CHANG, 2008; GHORAI et al., 2009). Eles também são ricos em riboflavina, tiamina, biotina, niacina, vitamina D e ácido ascórbico e dentre os minerais presentes estão potássio, ferro, manganês, zinco, magnésio, cálcio e selênio (CHANG e BUSWELL, 1996; MANZI et al., 1999; MATTILA et al., 2001; GHORAI et al., 2009; USDA, 2014).

3.1.1 Polissacarídeos fúngicos

Das 14.000-15.000 espécies conhecidas de cogumelos no mundo, aproximadamente 650 possuem poder medicinal e estima-se que 1800 espécies possam ser de interesse medicinal. Dos produtos hoje conhecidos, de 80 a 85 % são obtidos a partir dos corpos de frutificação, seja a partir de produções comerciais ou coletadas na natureza (CHANG, 2008; ELISASHVILI, 2012).

Estudos científicos há algumas décadas tem comprovado o poder medicinal dos cogumelos e inúmeros compostos com atividade biológica já foram identificados, com atividades antibióticas, antitumorais, anti-herpéticas, imunomoduladoras, entre outras. Os compostos responsáveis por essas atividades são fibras solúveis chamadas de exopolissacarídeos (CHANG e BUSWELL, 1996; OHNO et al., 2001; JOSE, AJITH e JANANRDHANAN, 2002; LINDEQUIST, NIEDERMEYER e JÜLICH, 2005; CARDOZO et al., 2011; CARDOZO et al., 2013a; 2013b). Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros formados por unidades repetidas de açúcares, e sua composição varia de acordo com o fungo e com sua etapa de vida. São secretados no meio e fazem parte da matriz extracelular. Tem como função proteger as hifas da desidratação e oferecer suporte às enzimas secretadas, mantendo um ambiente propício à digestão e absorção de nutrientes. Também são constituintes importantes da parede celular, chegando a compor 75 % da mesma e, consequentemente, sendo responsáveis por boa parte da biomassa total do fungo (GUTIÉRREZ et al., 1995; DEACON, 2006; SILVA et al., 2006; MAHAPATRA e BANERJEE, 2013).

As características dos EPS dependem da qualidade dos monômeros que os formam, dos tipos de ligações e níveis de ramificações existentes. Essas características por sua vez, dependem do meio onde o fungo cresce e de fatores como pH, fontes de carbono e de nitrogênio (GUTIÉRREZ et al., 1995; GERN et al., 2008; MAHAPATRA e BANERJEE, 2013).

Exopolissacarídeos com atividade biológica do tipo β -glucanas tem sido as mais estudadas, com foco nos EPS de *Lentinula edodes* (Lentinan), *Schizophyllum commune* (Schizophyllan), *Grifola frondosa* (Grifolan) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SSG). Os EPS encontrados nesses fungos são do tipo $(1\rightarrow6)$ - $(1\rightarrow3)$ - β -glucanas e possuem atividade imunomoduladora, antitrombótica, anticolesterol, reguladora de pressão e de nível de açúcar no sangue. As características desses EPS, tais como viscosidade, solubilidade, ramificação e estrutura tridimensional, diferem entre espécies e são responsáveis pelas diferenças de atividade biológica (BORCHERS et al., 2004; CHANG e BUSWELL, 1996; BORCHERS et

al., 2008; CHANG, 2008; BAK et al., 2014). Embora os primeiros estudos tenham focado nessas quatro espécies, atualmente um rol bastante grande e diverso de espécies tem sido investigado por suas propriedades medicinais, não se atendo apenas às espécies comestíveis. O principal foco tem sido em atividades antitumorais, mas não se limitando a estes (BORCHERS et al., 2004; 2008).

Estudos com *Pleurotus ostreatus* e *P. tuber-regium* demonstraram atividade antitumoral contra diferentes linhagens celulares e também atividade imunomoduladora. Para EPS de *P. ostreatus* e *P. eryngii* também foi relatada a atividade antioxidante (LIU et al., 2010; VAMANU, 2012; SUN et al., 2013). A β -glucana lentinano de *L. edodes* já foi largamente estudada e demonstrou potente ação antitumoral, com ativação de macrófagos *in vitro* e *in vivo*, além de efeitos imunoestimulantes de diferentes glucanas desse mesmo fungo (BORCHERS et al., 1999; PATERSON e LIMA, 2014).

O conjunto das características benéficas dos cogumelos comestíveis, chamadas de nutricêuticas, faz deles uma excelente fonte alimentar, especialmente para pessoas em situação de insegurança alimentar e nutricional. Segundo boletim da FAO (2013), 805 milhões de pessoas sofrem de fome crônica, apenas 100 milhões a menos que uma década atrás, tendo 709 milhões desse total vivendo em países em desenvolvimento. Com os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio, uma das metas é de reduzir esse número pela metade até o final de 2015, trabalhando em conjunto com os países atingidos por essa situação. Desses 805 milhões de pessoas, 70 % vivem em áreas rurais e dependem da agricultura como meio de vida. Nesse contexto, os cogumelos podem ter um papel importante para a erradicação da fome no mundo (MUSHWORLD, 2004; 2005; FAO 2005; CHANG 2008; IMTIAJ e RAHMAN, 2008; ZAMIL e CADILHON, 2009).

3.1.2 Resíduos agrícolas e a produção de cogumelos

O cultivo de cogumelos se dá majoritariamente em resíduos agrícolas, transformando-se materiais descartáveis em alimento de valor nutritivo. Esses resíduos são compostos por material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) de difícil degradação, e que acaba por acumular-se no ambiente, com biomassa seca anual estimada em $1,09 \times 10^{11}$ toneladas. De acordo com Chang (2008), cerca de 70 % de toda a produção agrícola e florestal é descartada por aplicação ineficiente e acaba por se acumular no ambiente. Com alguma frequência, esses

resíduos são reutilizados, sendo misturados ao solo como forma de adubação, secos e processados para enriquecer a alimentação de animais, transformados em cama de aviário ou queimados para gerar energia. Entretanto, a saída mais comum é a disposição incorreta desses materiais, que acaba por prejudicar o ambiente, pois são queimados em ambientes abertos ou são empilhados e descartados em locais inapropriados, contaminando o ambiente (KWON e CHOI, 2005; CHANG, 2008; CHANG e WASSER, 2012).

Uma maneira muito eficiente para a reutilização desses materiais é a produção de cogumelos. Cogumelos são capazes de crescer em uma gama bastante ampla de substratos e, por isso, virtualmente qualquer resíduo agrícola pode ser usado como substrato. Os substratos comumente utilizados são palhas de arroz, coco, trigo e feijão, polpa e casca de café, bagaço de cana, folhas de bananeira, serragem, resíduos de cervejarias, de destilarias e usinas açucareiras (STAMETS, 2000; KWON e CHOI, 2005; FAO, 2009; CHANG e WASSER, 2012).

Com o aumento da população mundial e os problemas gerados pela escassez de alimentos, a produção de cogumelos utilizando resíduos agrícolas está no centro do que é chamado de “*Nongreen Revolution*” ou “Revolução não-verde”, em tradução livre. A ideia central é a utilização completa dos resíduos agrícolas e industriais, com geração zero de resíduos ao final, também chamado de produtividade total. Após a colheita dos cogumelos, o substrato, ao invés de ser descartado, pode ser utilizado como fertilizante em plantações e como melhorador de solo, misturado à ração animal para aumentar seu teor nutritivo e também usado como cama para minhocário (CHANG, 2008; CHANG e WASSER, 2012). Essa reutilização de resíduos agrícolas torna-se bastante vantajosa para as populações rurais, que formam grande parte do contingente em situação de insegurança alimentar e nutricional (FAO, 2014). Os pequenos produtores rurais podem utilizar o resíduo de suas plantações para iniciar uma pequena produção de cogumelos. Além de dar uma destinação bastante eficaz aos resíduos, os cogumelos servem como fonte alimentar de alto valor nutricional, melhorando a qualidade da alimentação dessas populações. Além disso, o excedente da produção é facilmente vendido, tanto fresco como seco, e incrementa a renda familiar, tendo um impacto positivo na sua vida (KWON e CHOI, 2005; CHANG, 2008; FAO, 2009; CHANG e WASSER, 2012).

Iniciativas nesse sentido existem e têm sido aplicadas com êxito no mundo todo em parcerias entre governo, organizações não-governamentais (ONGs) e empresas de produção de cogumelos. Essas experiências mostram que a qualidade de vida das populações tem

melhorado com a implantação do cultivo de cogumelos, não apenas pela geração de renda extra através da venda dos cogumelos, mas também pela melhoria na alimentação. Os benefícios são mais claros para crianças e idosos, que possuem a saúde mais sensível. Além disso, nesses locais, tradicionalmente as mulheres cuidam da casa e com o cultivo de cogumelos surge a oportunidade de trabalho. Com frequência, os produtores mais bem sucedidos se tornam replicadores do conhecimento, educando outros produtores, fortalecendo o mercado local e colaborando para a melhoria da comunidade. Alguns exemplos de sucesso são as produções de *Coprinus comatus* na Tailândia, *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* no Zimbábue, (IMTIAJ e RAHMAN, 2008; ZAMIL e CADILHON, 2009).

3.1.3 Enzimas lignocelulolíticas

Para que os resíduos agrícolas sejam degradados e transformados de maneira eficiente, é necessário que os fungos que os colonizam produzam enzimas responsáveis pela degradação do material lignocelulósico. Os fungos capazes de degradar esses biopolímeros são chamados saprofitos e são os responsáveis, na natureza, pela ciclagem dos nutrientes estocados sob a forma de lignina e celulose presentes nesse material. Esses fungos são classificados como fungos da podridão parda, que são aqueles capazes de degradar parcialmente a madeira, quebrando apenas a celulose e as hemiceluloses, deixando a lignina presente intacta; e fungos da podridão branca, que degradam completamente a madeira, degradando a lignina, a celulose e as hemiceluloses. Os nomes têm origem na aparência da madeira ao final do processo de degradação (CHANG e MILES, 2004; DEACON, 2006; BARTON e NORTHUP, 2011).

O grupo de fungos da podridão branca é mais numeroso que o grupo de fungos da podridão parda, e inclui fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Uma característica importante de seu metabolismo é sua aptidão em utilizar o nitrogênio de maneira mais eficiente que outros fungos. Um exemplo disso é *Coriolus versicolor*, que em condições pobres de nitrogênio é capaz de direcionar o seu uso para a produção de enzimas extracelulares e componentes essenciais de parede celular, além de reciclar nitrogênio de seu próprio micélio (DEACON, 2006). Mas a característica mais importante dos organismos desse grupo, e que os colocam num patamar interessante do ponto de vista biotecnológico, é que são os únicos capazes de degradar completamente a lignina

(WEBSTER e WEBER, 2007; CHANG, 2008; CHANG e WASSER, 2012).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante no planeta, perdendo apenas para a celulose e é também o mais recalcitrante, ou seja, de mais difícil degradação (Figura 1).

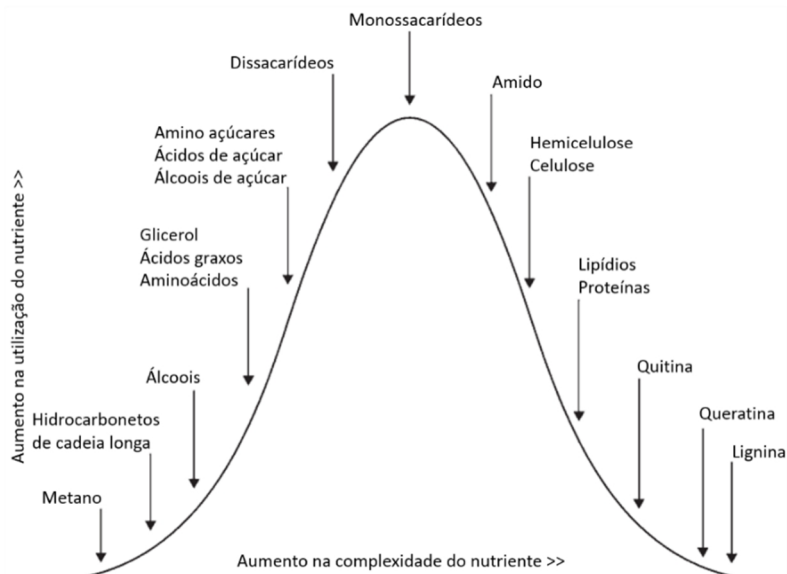


Figura 1. Complexidade de substratos *versus* utilização por organismos (adaptado de Deacon, 2006).

Dois grandes grupos enzimáticos são responsáveis pela degradação do material lignocelulósico: as celulasas e as peroxidases totais. As celulasas formam um grupo enzimático bastante diverso e as três principais enzimas deste complexo são a endoglucanase, a celobiohidrolase e a β -glicosidase (ou celobiase) (CHANG e MILES, 2004; DEACON, 2006). A endoglucanase age sobre pontos aleatórios da cadeia da celulose, quebrando-a em pedaços menores. A celobiohidrolase age nas extremidades livres desses fragmentos, liberando o dissacarídeo celobiose. A β -glicosidase então quebra esses dissacarídeos em seus monômeros de glicose, que podem ser utilizadas pelo fungo. As três enzimas são finamente reguladas, agindo eficientemente na degradação da celulose. Por ser um polímero insolúvel, acredita-se que as celulasas sejam expressas em níveis basais. O aumento na expressão dessas

enzimas depende da presença dos fragmentos provenientes da sua degradação. A velocidade de degradação da celulose depende da velocidade com a qual o fungo é capaz de absorver e utilizar esses monômeros de glicose, evitando que ela fique disponível para organismos competidores no ambiente (CHANG e MILES, 2004; DEACON, 2006).

As peroxidases e oxigenases são enzimas oxidativas, capazes de degradar a lignina através da geração de oxidantes fortes, que atacam a molécula, degradando-a a fragmentos cada vez menores. Esse grupo é composto por enzimas como a lacase, a manganês peroxidase, a glicose oxidase e a lignina peroxidase. A lacase é a principal delas, pois inicia a quebra dos anéis aromáticos que formam a lignina, permitindo o ataque das outras enzimas que participam dessa degradação. As enzimas manganês peroxidase, lignina peroxidase e glicose oxidase agem gerando ou transferindo oxidantes fortes e instáveis, que por sua vez iniciam uma reação em cadeia de degradação da lignina (DEACON, 2006, WEBSTER e WEBER, 2007). A produção dessas enzimas também permite que esses fungos sejam capazes de degradar compostos aromáticos poluentes presentes em locais contaminados (CHANG e MILES, 2004; MURPHY e HORGAN, 2005; WALKER e WHITE, 2005; DEACON, 2006).

3.1.4 Substratos para produção de cogumelos

A produção comercial de cogumelos demanda um substrato próprio para seu cultivo. A preparação desse substrato se dá através da compostagem, processo que tem por finalidade transformar o material bruto, melhorando a disponibilidade de nutrientes para que o fungo de interesse possa ser produzido. A compostagem também tem como objetivo eliminar micro-organismos que possam competir pelo substrato, interferindo no crescimento do fungo de interesse (MUDGETT, 1986; CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2004; 2005).

Cada espécie fúngica possui requerimentos próprios de substrato e, por isso, é importante que o produtor conheça a biologia do fungo que planeja produzir. Algumas espécies de *Pleurotus* e *Volvariella volvacea*, são decompositores primários e facilmente colonizam um substrato que passou por um processo rápido de compostagem ou mesmo não compostado. Já a espécie *Agaricus bisporus* é um decompositor secundário e necessita um substrato completamente compostado (DEACON, 2006).

Um bom substrato é composto por materiais vegetais fibrosos e volumosos suplementados com nutrientes minerais (principalmente

nitrogênio). A suplementação é necessária para que a proporção C:N adequada seja atingida. Ela pode ser feita através da adição de esterco ou ureia. A formulação do composto deve levar em conta a disponibilidade de material vegetal na região do produtor, o preço e sua qualidade, como ausência de agrotóxicos e contaminantes ambientais (EIRA e MINHONI, 1997; EIRA, 2000).

3.2 *SPAWN*

Spawn é o inoculante tradicional usado na produção de cogumelos, e sua produção é uma etapa importante dentro do processo, e também definirá a qualidade dos cogumelos. O fornecimento de inoculante tradicional de qualidade é o principal fator limitante na produção de cogumelos, uma vez que o atraso na sua produção pode acarretar atrasos e prejuízos para os produtores de cogumelos, o que, invariavelmente, gera aumento de custo no valor final dos produtos (STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004).

A inoculação do substrato não pode ser feita diretamente a partir do micélio em placas de Petri, é necessário que esse micélio seja crescido em um meio mais fácil e seguro de manusear e escalar. Tradicionalmente são usados grãos de cereais como trigo, centeio, sorgo, trigoilho e painço, mas também serragem, cavilhas e lascas de madeira (Figura 2). Virtualmente qualquer grão de cereal pode ser usado para a produção do inoculante tradicional e depende do produtor escolher aquele que melhor atende às suas necessidades (STAMETS e CHILTON, 1984; STAMETS, 2000).

O objetivo principal do inoculante é impulsionar o micélio fúngico para um estado de vigor fisiológico que o permita colonizar o substrato e também agir como um veículo para que o micélio seja distribuído de maneira uniforme quando inoculado. Os grãos de cereais são amplamente utilizados, pois, além de desempenharem bem esse objetivo, tem duas vantagens importantíssimas: funcionam como suplemento nutricional, fornecendo a energia necessária para o fungo iniciar a colonização e também funcionam como cápsulas micelianas, permitindo que o fungo se espalhe a partir dali (STAMETS, 2000).

Essa energia fornecida pelo grão é bastante importante nos primeiros momentos da colonização do substrato, quando há necessidade de uma grande adaptação, uma vez que há a necessidade de produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato. O amido e as proteínas contidas no grão fornecem a energia e a matéria prima

necessárias para que o fungo colonize rapidamente (STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004).

O micélio utilizado como inoculante deve ser um micélio dicariótico, originado pelo encontro de hifas compatíveis e que é capaz de gerar frutificações. Esse micélio dicariótico costuma ser mais vigoroso que o monocariótico e para muitas espécies é possível observar a presença de grampos de conexão quando ocorre a dicarioidia (CHANG e MILES, 2004). Uma maneira para o produtor garantir esse tipo de micélio, é a compra do produto de empresas especializadas ou então o isolamento a partir dos corpos de frutificação da estirpe desejada. A partir desse micélio então é possível produzir o inoculante (EIRA, 2000).

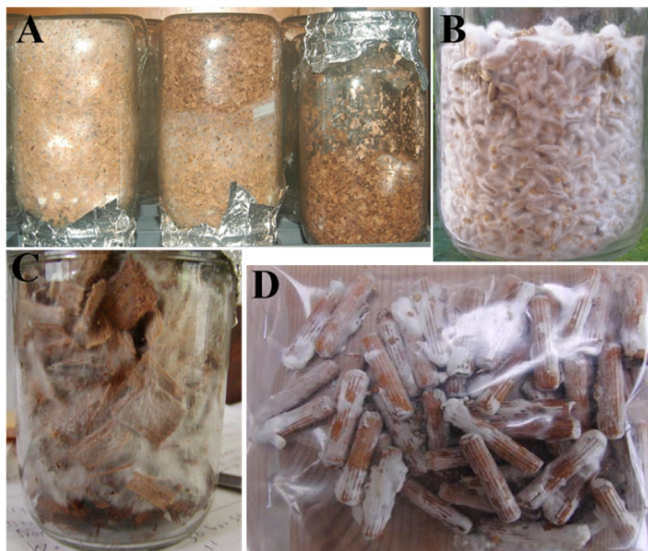


Figura 2. Diferentes tipos de inoculante: A) serragem (fonte: shroomery.org), B) grãos (fonte: mycotek.org), C) lascas (fonte: shroomery.org), D) cavilhas (fonte: mushroombox.co.uk).

3.2.1 Produção de inoculante

A produção do inoculante tradicional é realizada por um processo chamado de fermentação em estado sólido, com baixo teor de água livre, a fim de evitar contaminações por bactérias, e é bem difundido entre os produtores de cogumelos. O termo fermentação nesse caso não é utilizado

no seu sentido bioquímico, mas sim para indicar um processo biotecnológico, tanto aeróbio como anaeróbio de produção de biomassa.

Para que o inoculante seja produzido, os grãos precisam ser preparados previamente à inoculação. Além de sua hidratação, tornando-os mais propícios para a inoculação, também é importante que os contaminantes neles presentes sejam eliminados. Normalmente os grãos são cozidos em água fervente por algumas horas e a água do cozimento é descartada, sendo então acondicionados em sacos plásticos ou frascos e passam por um processo de pasteurização ou esterilização. Os cuidados com esses procedimentos devem levar em conta o grau de hidratação dos grãos. A umidade ideal gira em torno de 50%. Essa umidade garante que o grão não estoure e que não haja umidade disponível para outros micro-organismos. A integridade do grão evita que os nutrientes sejam expostos e fiquem disponíveis para possíveis contaminantes. Ela também evita a formação de aglomerados, que dificultam a troca gasosa e a separação do inoculante para a subsequente inoculação (STAMETS e CHILTON, 1984; STAMETS, 2000).

Os grãos devidamente embalados são inoculados com pedaços de micélio cortados a partir de placas de Petri e, após a completa colonização dos grãos, são utilizados para uma nova inoculação em um processo de aumento de escala. O processo leva de 2 a 3 meses para ser completado. A transferência só pode ser realizada após a colonização completa dos grãos, uma vez que grãos não colonizados são propícios a contaminar, inutilizando aquele material. O processo é feito de maneira escalonada e asséptica, para ter um maior controle sobre a colonização e observar a presença de possíveis contaminantes. Caso um frasco não seja completamente colonizado ou apresente contaminação, o material deve ser descartado, a fim de não prejudicar a continuidade do processo (CHANG e MILES, 2004). O escalonamento costuma ser feito na proporção, em volume, de 1:10 a 1:40 (inoculante:grãos), garantindo uma rápida e eficiente colonização dos novos grãos, aproveitando o vigor máximo do micélio fúngico. Um escalonamento maior necessita um tempo maior para a colonização total do substrato. Além disso, volumes muito grandes tendem a ter regiões de anaerobiose em seu interior, facilitando o crescimento de bactérias (STAMETS, 2000).

O inoculante produzido precisa ser utilizado prontamente, respeitando o estado metabólico do fungo. O micélio perde vigor ao longo do tempo de armazenamento, a velocidade de crescimento diminui e produtos de excreção começam a se acumular, diminuindo a viabilidade do inoculante. Micro-organismos oportunistas se beneficiam dessa perda de vitalidade para iniciar a colonização do material, inutilizando-o. Uma

maneira de aumentar sua viabilidade é o armazenamento sob refrigeração, que diminui o metabolismo fúngico e retarda o seu envelhecimento. Quando isso ocorre é necessário o aumento da quantidade de inoculante utilizada para inocular o substrato, para compensar a viabilidade perdida durante o armazenamento (STAMETS e CHILTON, 1984; STAMETS, 2000).

Os fungos filamentosos estão adaptados a esse tipo de crescimento, pois facilmente colonizam o substrato sólido, onde as enzimas se acumulam para degradar a matéria orgânica (BRUM, 2005). Embora seja um processo bastante simples, barato e amplamente utilizado, a FES tem alguns problemas quanto à homogeneização do meio (WALTER e PAAU, 1993). O crescimento do fungo gera muito calor pelo processo chamado de termogênese, e que, quando em excesso, pode prejudicar o crescimento. Este fato resulta da dificuldade da transferência de calor e massa no substrato sólido, resultando num difícil controle da temperatura. Outros parâmetros importantes como pH, disponibilidade de oxigênio e umidade não são facilmente controlados e às vezes se faz necessário o manuseio do material, aumentando as chances de contaminação. Além disso, é difícil acompanhar a utilização dos nutrientes e por consequência, a evolução dos cultivos (STAMETS, 2000; ELISASHVILI, 2012).

Outro problema com relação à FES é a quantidade de material necessária à produção do inoculante e o espaço para armazenamento dos potes/sacos durante o escalonamento. Equipamentos adequados para a esterilização e manipulação do material são fundamentais para o sucesso do processo, assim como salas limpas com controle de umidade e temperatura, com espaço suficiente para armazenar todo o material produzido. O conjunto desses fatores pode representar gastos excessivos para um produtor, gerando aumento de custo de sua produção.

Uma alternativa para melhorar o processo é o cultivo de fungos por fermentação submersa (FSm) (ROSSI, 2001; 2006; CAMELINI, 2010; CONFORTIN et al., 2008; ABDULLAH et al., 2013).

3.2.2 Fermentação submersa

O processo de fermentação submersa é o processo de cultivo de micro-organismos em meio de cultura líquido. Esse tipo de cultivo apresenta diversas vantagens com relação à FES. Uma das principais vantagens é a possibilidade e facilidade de homogeneização durante o processo. A homogeneização é possível, pois o meio é facilmente misturado, eliminando as diferenças que são geradas conforme o

crescimento do micro-organismo. O meio líquido permite que fatores importantes, como temperatura e pH, sejam facilmente medidos e controlados. Além disso, o consumo dos nutrientes se dá de forma mais completa, permitindo o máximo aproveitamento dos nutrientes e máximo crescimento. Essas variáveis podem ser medidas e controladas devido à maior precisão das amostras retiradas durante o cultivo (ROSSI, 2006; ELISASHVILI, 2012). Outra vantagem associada à FSm, é a rapidez com a qual os cultivos são realizados, diminuindo o tempo de produção e consequentemente as chances de ocorrência de contaminações. Isso se deve à facilidade com a qual os nutrientes são dispersos no meio, maximizando a área de contato entre micro-organismo e nutrientes (ROSSI, 2006).

O acompanhamento do cultivo e sua rapidez permitem que alterações na composição do meio e nas condições de cultivo sejam efetuadas a cada novo cultivo, melhorando o entendimento sobre a biologia do fungo estudado e otimizando a obtenção de biomassa e outros produtos de interesse, sem que haja aumento excessivo nos custos de produção (ELISASHVILI, 2012; ABDULLAH et al., 2013). Esses cultivos podem ser realizados em frascos estáticos e agitados, com aeração forçada e também em biorreatores. Os estudos em frascos pequenos tem o intuito de avaliar as melhores condições de cultivo para que o processo possa ser escalonado, diminuindo o risco de falha no processo no nível industrial.

O cultivo de fungos filamentosos por FSm já é uma prática bastante difundida, com foco principal na obtenção de produtos provenientes do metabolismo primário ou secundário secretados no meio – tais como proteínas, enzimas, ácidos, antibióticos, EPS e outros compostos bioativos, medicinais e/ou de uso industrial e também biomassa para utilização como suplemento alimentar (SMÂNIA et al., 1995; KACHLISHVILI et al., 2006; LIN e SUNG, 2006; CONFORTIN et al., 2008; SHIH et al., 2008; BETTIN et al., 2009; DAS, et al., 2010; SAEKI et al., 2011; ELISASHVILI, 2012; VAMANU, 2012; SINGH, VISHWAKARMA e SRIVASTAVA, 2013). Estudos com foco na produção de biomassa para produção de inoculantes são bem menos numerosos, mas aos poucos vão preenchendo a lacuna de conhecimento nessa área (MAUPÉRIN et al., 1987; STAMETS, 2000; ROSADO, KEMMELMEIER e COSTA, 2002; ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002; ROSSI 2006; ABDULLAH, 2013).

A biomassa obtida por FSm pode ser utilizada como inoculante para produção de cogumelos comestíveis, quando imobilizada em hidrogel, substituindo o inoculante tradicional (ROSSI et al., 2004).

3.2.3 Imobilização em hidrogel de alginato

A utilização de polímeros naturais para a obtenção de cápsulas está bem estabelecida no meio científico e também nas indústrias alimentícia e farmacêutica (GIBBS et al., 1999). A imobilização em hidrogel consiste no encapsulamento do material desejado dentro de uma matriz polimérica. O principal objetivo do processo é proteger o conteúdo da cápsula das variações do ambiente externo, mas permitindo a passagem de moléculas. O encapsulamento também permite a adição de diferentes materiais em seu interior, permitindo que combinações sejam formuladas de acordo com o interesse do pesquisador (MAUPÉRIN et al., 1987; GIBBS et al., 1999).

Os primeiros estudos datam da década de 1970 e foram conduzidos com o objetivo de encapsular produtos para uso na indústria de alimentos como óleos, vitaminas, aromatizantes e conservantes (GIBBS et al., 1999). Nessa mesma década, os estudos para o encapsulamento de células e micro-organismos em cápsulas de alginato de cálcio foram iniciados com resultados promissores.

O alginato é uma família de polissacarídeos de ocorrência natural obtido principalmente a partir de três espécies de algas marrons: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. Sua cadeia linear é composta por resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico com ligações 1 \rightarrow 4. A variação na sequência desses resíduos é o que confere as características físico-químicas do polissacarídeo (GOMBOTZ e WEE, 1998).

O alginato vem sendo cada vez mais utilizado na indústria biotecnológica com aplicação para confecção de sementes sintéticas para plantas (SAKHANOKHO, POUNDERS e BLYTHE, 2013), terapia gênica e liberação de vacinas, proteínas e moléculas bioativas em tecidos-alvo (GOMBOTZ e WEE, 1998; DANG e LEONG, 2006; ONISHI et al., 2010), produção de estruturas multicelulares em 3D (ANDERSEN et al., 2013), imobilização de bactérias em processos de descontaminação (DERIKVAND e ETEMADIFAR, 2014) e como probióticos (LOTFIPOUR, MIRZAEI e MAGHSOODI, 2012). Tudo isso devido a suas propriedades quando polimerizado. Ele forma uma matriz aquosa relativamente inerte, tem as condições de encapsulamento amenas, alta porosidade do gel, permitindo a passagem de macromoléculas e a possibilidade de alteração nas condições de gelificação (temperatura, pH, viscosidade, tamanho, entre outros) (GIBBS et al., 1999; GOMBOTZ e WEE, 1998).

Os estudos para produção e imobilização de biomassa fúngica em cápsulas de alginato iniciaram na década de 1980 com fungos ectomicorrízicos para utilização em mudas de plantas em viveiros. Esses estudos possibilitaram o surgimento de um novo tipo de inoculante, com maior controle na sua produção e maior estabilidade ao longo do tempo (LE TACON et al., 1983; LE TACON et al., 1985; MAUPÉRIN et al., 1987).

Maupérin et al. (1987) observaram que após 5 meses de armazenamento sob refrigeração, as cápsulas contendo micélio de *Hebeloma crustuliniforme* mantiveram mais de 90 % de viabilidade e que esse tipo de inóculo podia tolerar até 10 meses armazenado a 4 °C. Kuek, Tommerup e Malajczuck (1992) averiguaram a viabilidade de inoculantes comerciais e observaram que cápsulas de *Laccaria laccata* e *Hebeloma westraliense* permaneceram viáveis por pelo menos seis meses, mas que a viabilidade é menor para outros fungos, como *Elaphomyces* sp.

Trabalhos mais recentes, realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, pelo antigo Laboratório de Ectomicorrizas e pelo Laboratório de Bioprocessos (LBP) tem mostrado sucesso na confecção de cápsulas contendo fungos ectomicorrízicos (ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA, 2004; ROSSI, 2006). Também foi produzido um inoculante de *Agaricus brasiliensis* para produção de cogumelos, com biomassa produzida em biorreator do tipo *airlift* com posterior encapsulamento da biomassa (ROSSI et al., 2004). O LBP em parcerias com outros grupos de pesquisa produz inoculantes fúngicos para testes a campo e em casa de vegetação, com o objetivo de avaliar sua viabilidade e eficiência (SANTOS et al., 2012; AVELAR et al., 2013).

A facilidade de transporte e armazenamento do inoculante em alginato pode oferecer maior autonomia de produção ao produtor de cogumelos. O espaço que seria destinado para a produção de inoculante pode ser direcionado a áreas produtivas, aumentando a rentabilidade do negócio. Quando a biomassa fúngica é produzida por FSm em biorreatores para posterior encapsulamento, há também o ganho no tempo total necessário à produção do inoculante (ROSSI et al., 2004).

3.3 BIORREADORES

Biorreatores são equipamentos fechados, utilizados para a realização de processos fermentativos, tanto em escala de pesquisa como em escala industrial, com diferença em relação ao tamanho dos equipamentos utilizados. São comumente chamados de fermentadores,

pois servem para a realização de processos microbianos, mas quase todos os processos realizados na indústria são aeróbios (MADIGAN et al., 2010). Assim como acontece com a FES, os cultivos realizados em biorreatores por FSm também são realizados por escalonamento. Durante esse processo, estudos sobre termodinâmica, dinâmica de fluidos, transferência de gases e massa e necessidade de aeração e agitação devem ser efetuados (SCHMIDELL, 2001).

Na indústria sua principal função é o cultivo de micro-organismos para obtenção de produtos derivados do metabolismo primário (enzimas, álcool, ácidos orgânicos, entre outros) e do metabolismo secundário (antibióticos, hormônios de plantas, alcaloides, entre outros) (KAVANAGH, 2005; MADIGAN, 2010).

Os biorreatores são equipamentos automatizados, com sistemas de controle das variáveis do processo, para acompanhamento e otimização dos cultivos. A gama de possibilidades de construção de diferentes biorreatores para suprimento das necessidades de processo torna-os versáteis e com grande potencial de aplicação industrial. Normalmente são construídos em aço inoxidável, com conexões para acoplamento de sensores e válvulas. Além disso, eles são esterilizáveis, permitindo cultivos axênicos. O controle do processo passa pela capacidade de acompanhamento das variáveis físico-químicas, seja por meio de sensores acoplados ao biorreator, seja pela retirada de amostras (MADIGAN, 2010; ROSSI, 2006). Esse acompanhamento permite a rápida alteração das condições de cultivo, melhorando o desempenho do processo.

A principal função de um biorreator para cultivo aeróbio é a transferência de oxigênio, sendo esse o principal limitante do crescimento microbiano (SCHMIDELL, 2001). Por outro lado, o crescimento microbiano, bem como seus metabólitos podem alterar a viscosidade do meio, sendo um dos fatores que mais afeta essa transferência. A morfologia dos fungos filamentosos tem interferência direta na viscosidade do meio e as condições do cultivo determinam se o micélio crescerá de forma livre ou em *pellets*. A formação de *pellets* é bastante comum em cultivos e essa morfologia ajuda a evitar as variações de densidade no meio. Por sua vez, o tamanho, forma e superfície dos *pellets* também interferem nas propriedades reológicas do líquido e podem dificultar a transferência de oxigênio, gerando regiões de anaerobiose no interior dos *pellets* (PROSSER e TOUGH, 1991; ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002). Lidar com essas variáveis é um dos grandes desafios desses bioprocessos.

Na indústria, dois conceitos de biorreatores são amplamente utilizados, de acordo com a característica do cultivo e do micro-

organismo utilizado: os de tanque agitado e os pneumáticos (CHISTI, 1989; KAVANAGH, 2005). Atualmente, o que limita o uso total do potencial dos biorreatores e o escalonamento de processos para alguns tipos de micro-organismos é a falta de conhecimento da engenharia dos bioprocessos (ROSSI 2006; ELISASHVILI, 2012).

3.3.1 Biorreatores para cultivo de fungos filamentosos

O desenvolvimento de um bioprocessos deve satisfazer uma sequência de etapas cujo centro é representado por um biorreator. Sistemas de troca de calor, esterilização, limpeza e controle completam o processo. O projeto do biorreator, por sua vez, envolve vários aspectos, como a cinética das reações, os fenômenos de transporte, as formas de operação, além das questões estruturais (CHISTI, 1989).

O tipo mais utilizado em cultivos celulares é o de tanque agitado (STR), devido a aplicação dos reatores químicos pré-existentes no passado. Esses biorreatores utilizam sistemas de pás ou turbinas para agitar e aerar o meio de cultura, demandando uma construção mais sofisticada e cara, principalmente por causa do eixo de suporte das pás de agitação, que atravessa o biorreator. A maioria dos bioprocessos exige que o cultivo se mantenha asséptico por longos períodos, necessitando que esses biorreatores sejam equipados com selos mecânicos complexos. Para micro-organismos filamentosos, os biorreatores de tanque agitado nem sempre são os mais adequados, sobretudo porque o grau de agitação requerido para atingir a transferência de massa pode causar danos aos microrganismos devido às zonas de alto cisalhamento das pás do agitador.

Um tipo menos utilizado é representado pelos biorreatores pneumáticos, que não possuem agitação mecânica, como é o caso dos biorreatores de colunas de bolhas e *airlifts*. A diferença entre esses, é que nos biorreatores *airlift* o volume de líquido é dividido em duas zonas distintas, onde somente uma recebe a injeção de ar (Figura 3). A diferença de densidade do líquido entre essas regiões causa a circulação do fluido no biorreator por uma ação *air-lift* (MERCHUK, 1990; CHISTI, 1989). A parte do biorreator que contém a mistura gás-líquido em fluxo ascendente é denominada de *riser*, e a região que contém o líquido em fluxo descendente é o *downcomer*. A circulação de líquido dentro do biorreator é fundamental para seu desempenho adequado, pois está relacionada com as variáveis mais importantes do processo, como a turbulência que afeta o tamanho das bolhas e o tempo de mistura.

Biorreatores pneumáticos são biorreatores com altura elevada, geralmente acima de 10 vezes o diâmetro, contrastando com os STR que tem altura de duas a três vezes seu diâmetro. Isso se faz necessário porque as bolhas precisam de tempo de contato com o líquido para transferirem o oxigênio e absorverem o gás carbônico. No STR a agitação forçada mantém as bolhas em contato mais tempo com o líquido, além de serem continuamente quebradas, aumentando a área de transferência.

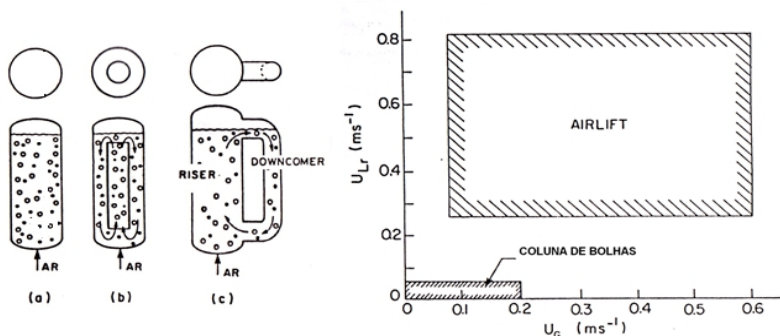


Figura 3. Biorreatores pneumáticos: coluna de bolhas (a), *airlift* com circulação interna (b) e *airlift* com circulação externa. O gráfico representa as faixas de operação entre os dois conceitos com relação a velocidade do gás (U_g) e a velocidade de circulação de líquido (U_L).

Uma grande variedade de configurações de biorreatores *airlift* tem sido estudada. Existem duas classes básicas: os de circulação interna e os de circulação externa (Figura 3). Modificações adicionais podem ser introduzidas no topo do biorreator, onde a eficiência do separador de gás pode influenciar significativamente o desempenho do biorreator (SIEGEL, MERCHUK e SCHÜGERL, 1986). Os primeiros são confeccionados em uma parte única, com uma coluna interna que recebe a injeção de ar. Os últimos possuem duas partes, conectadas pelo topo e pela base para que o líquido circule.

A demanda energética para a manutenção do cultivo em biorreator *airlift* é bem menor do que aquela necessária para os STR, tornando-os vantajosos para desenvolvimento de bioprocessos. O ar injetado não só fornece o oxigênio necessário como também agita o líquido. Além disso, o pequeno tamanho das bolhas de ar aumenta a superfície de contato gás-líquido, melhorando a transferência de oxigênio, além de melhorar a transferência de massa e calor. A turbulência causada pela aeração também é menor e, conseqüentemente, as tensões de cisalhamento são

menores. A aeração as tornam mais homogêneas por toda a coluna, causando menor estresse às células (MERCHUK, 1990).

3.3.2 Hidrodinâmica gás-líquido

Três parâmetros hidrodinâmicos de grande interesse em projetos de biorreatores *airlift* são *holdup* do gás, a velocidade de circulação de líquido e o tempo de mistura. O *holdup* do gás refere-se à fração de gás na dispersão gás-líquido. Esse parâmetro, em combinação com o tamanho das bolhas, determina o tempo de residência do gás no líquido, influenciando a área interfacial disponível para transferência de oxigênio (CHISTI, 1989). O processo de coalescência das bolhas, resultante do aumento da frequência de colisão, tende a limitar o *holdup* em valores baixos, sendo da ordem de 0,3 os valores máximos utilizados em biorreatores. Um valor elevado de *holdup* é alcançado com a redução do tamanho de bolha, podendo se tornar até inadequado. Isto ocorre porque um gás com bolhas muito pequenas pode ter um tempo de residência muito longo e entrar em equilíbrio com o líquido, atuando, em parte, como um volume morto.

A circulação de líquido num biorreator *airlift* resulta da diferença de densidade do líquido entre o *riser* e o *downcomer*, como visto anteriormente. A diferença de gás *holdup* entre essas regiões afeta a velocidade de circulação do líquido que, por sua vez, afeta o *holdup* pelo aumento ou diminuição da velocidade de subida das bolhas (ROSSI, 2006). Além disso, a circulação afeta a turbulência, os coeficientes de transferência de calor, a transferência de massa gás-líquido, e as forças de cisalhamento às quais os microrganismos estão expostos (CHISTI e MOO-YOUNG, 1988). O gráfico da Figura 3 mostra a importância da circulação de líquido, onde as faixas de operação dos *airlifts* é bastante ampliado em relação ao coluna de bolhas, e isso significa dizer que a capacidade de transferência de massa é consequentemente bastante ampliada.

As características de mistura das fases gasosa e líquida, além da sólida (micro-organismos), têm uma forte influência no desempenho do biorreator. Se, por um lado, a mistura é afetada pela turbulência, por outro, ela afeta os gradientes para transferência de calor e massa. A mistura deve proporcionar uma rápida dispersão dos pulsos de ácido/base injetados no biorreator para controle do pH, tanto para prevenir regiões com altas concentrações por longos períodos que poderiam causar danos ao metabolismo, tanto para o próprio funcionamento do sistema de controle.

Além disso, com relação ao oxigênio, deve fornecer condições homogêneas de transferência e evitar zonas mortas onde possa ocorrer anóxia (ausência do oxigênio). Da mesma forma, é necessária a rápida mistura dos fluidos adjacentes aos trocadores de calor (CHISTI, 1989).

Uma restrição para a mistura e transferência de massa em sistemas biológicos é imposta pelo nível de cisalhamento que pode ser tolerado. Zonas do biorreator com excessivas forças de cisalhamento podem causar danos físicos a microrganismos filamentosos (KOSSEN e METZ, 1976; WASE et al., 1985). Essas restrições estão se tornando cada vez mais importantes devido aos avanços biotecnológicos e ao aumento das indústrias que utilizam culturas de células animais e microrganismos geneticamente modificados, que geralmente são mecanicamente menos resistentes. Assim, existe a necessidade de novos projetos de biorreatores e de regimes de operação. O grau de cisalhamento também pode afetar a morfologia de crescimento. O nível dessas forças pode determinar se um fungo crescerá na forma de micélio livre ou na forma de *pellets*. Os efeitos físicos da agitação podem remover fragmentos de hifas da superfície dos *pellets* e, também, provocar sua ruptura (TAGUCHI et al., 1968). O crescimento peletizado pode impor limitações adicionais na transferência de oxigênio para o interior dos aglomerados de hifas (ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002).

Com relação a aplicação de biorreatores pneumáticos para a produção de micélio para utilização como inoculante para o cultivo de cogumelos, outra grande vantagem é que devido a simplicidade desses biorreatores, podem ser fabricados com um custo menor e aplicando apenas técnicas básicas de tornearia e soldagem em aço inox. Os diâmetros reduzidos desses equipamentos implicam também na necessidade de paredes menos espessas que os STR com consequente economia de material. Por essas simples razões, pode-se com facilidade construir um sistema de cultivo que pode ser utilizado por produtores de cogumelos ou empresas que trabalham com esse tipo de inoculante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados fúngicos

Para este trabalho duas espécies fúngicas foram selecionadas: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (1975), conhecido como *shiitake*, e *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Jacq.) P. Kumm. (1871), conhecido como cogumelo ostra-cinza. Essas duas espécies são fungos da podridão-branca e pertencem ao filo Basidiomycota. Na natureza esses fungos são encontrados crescendo sobre troncos de árvores, participando da degradação do material lignocelulósico. São bastante consumidos e por isso seu cultivo é bastante difundido em todo o mundo. Os cogumelos desses fungos foram cedidos pela empresa Fungi Brasilis e Verduras Verdes localizada em Biguaçu, SC. A escolha desses fungos é apenas para servirem como modelo para o desenvolvimento do processo de produção de inoculante em cultivo submerso, de modo que o processo possa também servir para outros fungos comestíveis e medicinais.

A obtenção da cultura pura se deu pelo isolamento a partir de um cogumelo de cada espécie sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar, a partir da retirada de pedaços da parte interna do basidioma e transferência para uma placa contendo o meio Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C para crescimento e a verificação da pureza das culturas foi feita pela observação do micélio em lupa estereoscópica. Confirmada a pureza, o micélio foi então repicado para novas placas.

4.2 Manutenção das culturas

As culturas estoques foram mantidas em placas de Petri com meio BDA diluído (o preparo do meio se deu com 1/3 do recomendado pelo fabricante, com adição de 5 g de ágar por litro de meio). Essas placas foram incubadas a 25 ± 1 °C e após o crescimento do micélio foram mantidas em geladeira a temperatura de 8 °C (LEE et al., 2004; BARRETO, LÓPEZ e LEVIN, 2008). As culturas estoques foram repicadas mensalmente e as placas mantidas em geladeira após o crescimento em incubadora, sendo renovadas conforme a necessidade.

4.3 Meio de cultura para cultivo submerso

Para o cultivo submerso foi utilizado como base o meio Melin-Norkrans Modificado (MNM) (MARX, 1969) com algumas modificações sugeridas por Rossi (2001), que continha (em g/L): glicose 10; extrato de malte 3; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,750; KH_2PO_4 0,500; K_2HPO_4 0,700; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,050; NaCl 0,025; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,150; além de 1,2 mL de FeCl_3 (solução 1 %) e 100 μg de tiamina-HCl. O pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização, que foi realizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Quando se esterilizava um volume de meio maior, como no caso do cultivo em biorreator, o tempo de esterilização foi de 30 minutos.

4.4 Preparo do inóculo de cultivo

A partir das culturas estoque, novas placas foram repicadas e crescidas durante 15 dias. Após esse período, cinco discos de micélio crescidos em ágar, de 8 mm de diâmetro, foram cortados e transferidos para erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio MNM. Os frascos foram cobertos com três camadas de papel alumínio, seladas com filme de PVC e mantidos em incubadora a 25 ± 1 °C por 15 dias. A partir desses frascos, o inóculo foi preparado fragmentando-se asépticamente o micélio em solução salina (0,85 % de NaCl) em liquidificador a 3600 rpm por 20 s. A concentração inicial de biomassa foi de aproximadamente 0,25 g/L. A suspensão miceliana obtida foi armazenada em frascos selados com filme de PVC e mantidos em geladeira a 8 °C até seu uso.

4.5 Cultivo em frascos aerados

A fim de simular as condições de cultivo em biorreator, cultivos preliminares em frascos com meio de cultura líquido foram realizados para avaliar a capacidade dos fungos em tolerar as condições de cultura sob aeração forçada e produzir biomassa.

Os cultivos foram feitos em frascos erlenmeyers de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura MNM, inoculados com 100 mL da suspensão miceliana. Para evitar a formação de espuma durante o cultivo, 0,4 mL/L de polipropileno glicol foi adicionado ao meio de cultura para todos os cultivos realizados sob condição de aeração, antes do procedimento de esterilização. O cultivo foi conduzido em estufa a 25 ± 1 °C por até 15 dias. Os frascos estavam equipados com uma mangueira para permitir a

aeração. Na saída desta mangueira foi acoplada uma pedra porosa, com o objetivo de diminuir o tamanho das bolhas de ar que aeravam o líquido, aumentando a superfície de contato do ar com o meio de cultura, promovendo maior aporte de oxigênio para o fungo. A boca do frasco foi fechada com um tampão de algodão em torno dessa mangueira, que servia para filtrar a saída dos gases. Uma membrana filtrante Millex® – FG de 0,20 µm (Millipore – Merck S/A, Cotia –SP), foi usada para esterilização do ar. A entrada da mangueira foi acoplada a um compressor de ar, que foi mantido ligado durante todo o experimento. Para que o nível do cultivo não fosse alterado pela entrada do ar seco do ambiente externo, um umidificador foi utilizado (ROSSI, 2006).

4.5.1 Aditivos nutrientes

Três aditivos diferentes foram escolhidos para suplementar o meio de cultura. Primeiramente, para os cultivos aerados, foram escolhidas a farinha de trigo integral (marca VITAO) com o intuito de simular as condições no inoculante tradicional que é produzido em grão de trigo e a serragem de eucalipto utilizada como substrato para cultivo de cogumelos. A serragem de eucalipto foi fornecida pela empresa Fungi Brasilis e Verduras Verdes e foi seca a 60 °C durante 3 dias, sendo então moída até que atingisse uma granulometria semelhante à da farinha de trigo integral. Foram realizados três cultivos para cada fungo com diferentes tratamentos: meio MNM, meio MNM+farinha e MNM+serragem. Foi usado 2 g/L de cada aditivo em seu respectivo meio de cultura. A biomassa obtida a partir desses cultivos, contendo também o residual dos aditivos, foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio.

O terceiro aditivo nutriente foi utilizado posteriormente para a realização de um experimento fatorial completo, e então para o cultivo no biorreator. O aditivo escolhido foi o farelo de trigo, e sua escolha foi baseada na sua composição intermediária entre a farinha de trigo integral e a serragem.

4.5.2 Encapsulamento da biomassa em hidrogel

A metodologia utilizada para o encapsulamento da biomassa foi descrita por Maupérin e colaboradores (1987). O encapsulamento foi feito a partir de uma suspensão miceliana preparada conforme metodologia descrita anteriormente. Para cada cultivo, volumes iguais do fragmentado

e de solução estéril de alginato de sódio (2 %; m:v) foram adicionadas a um frasco gotejador. Essa mistura foi gotejada em uma solução 5 mol/L de CaCl_2 , sob agitação constante, até a polimerização total das cápsulas. Esse processo leva cerca de 30 minutos e pode ser aferido visualmente pela precipitação das cápsulas na solução de cloreto de cálcio. Em seguida as cápsulas foram lavadas em água destilada estéril e transferidas para um frasco contendo solução salina (0,85 % de NaCl) suficiente para que fiquem completamente submersas. Esses frascos foram selados com filme de PVC e armazenados a 8 °C para verificar a viabilidade dos fungos ao longo do tempo. O fungo imobilizado em gel será denominado doravante de “inoculante em alginato”, para diferenciar do inoculante produzido em grãos, denominado “inoculante tradicional”. Um esquema do procedimento de produção do inoculante em alginato pode ser visto na Figura 4.

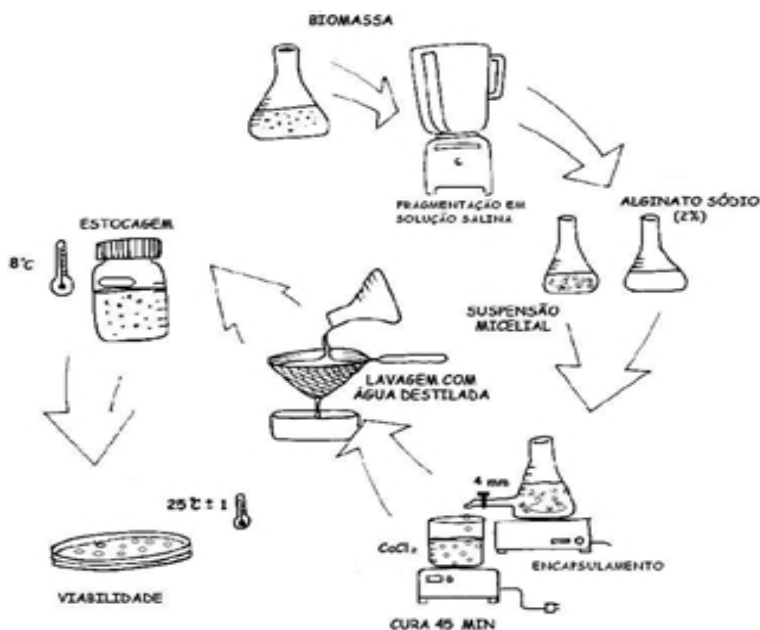


Figura 4. Procedimento para encapsulamento de biomassa fúngica em gel de alginato de cálcio (adaptado de Rossi, 2006).

4.5.3 Testes de viabilidade dos inoculantes

Os testes de viabilidade foram realizados por um período de seis meses, tempo recomendado pela legislação brasileira para inoculantes de aplicação agrícola (ROSSI, 2006). Para cada inoculante, duas placas (meio BDA) para testar a viabilidade foram feitas a cada três semanas. Em cada placa foram colocadas cerca de 25 cápsulas. As placas foram mantidas em incubadora a 25 ± 1 °C. A viabilidade foi aferida diariamente, até a emergência total das hifas. A resposta da viabilidade foi dada em dias para emissão total das hifas em função do tempo de armazenamento.

4.6 Avaliação da atividade de enzimas lignocelulolíticas

Para avaliar a capacidade dos isolados em produzir enzimas lignocelulolíticas em meio líquido, foi realizado um experimento utilizando meio mínimo (MNM sem glicose e sem extrato de malte). Como única fonte de carbono foi adicionado 2 g/L do substrato em pó (serragem) (item 4.5.1). Frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura com a serragem receberam 1 disco de micélio e foram incubados por 20 dias, em incubadora a 25 ± 1 °C. O teste foi feito em triplicata para cada fungo. Como controle 1 disco de micélio foi colocado em meio de cultura mínimo sem adição da serragem, também em triplicata. Após o período de incubação, o conteúdo do frasco foi filtrado, separando a biomassa do meio de cultura, e o filtrado foi utilizado para as análises enzimáticas.

Foram avaliadas as atividades de peroxidases e β -glicosidase no filtrado, além da concentração total de proteínas. A atividade de β -glicosidase foi medida pela liberação de p-nitrofenil a partir de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo a 410 nm ($\epsilon_{410}=18,5$ l/mol/L/cm) (TAN, MAYERS e SADDLER, 1987). A atividade de peroxidase foi medida monitorando a oxidação da o-dianizidina a 460 nm ($\epsilon_{460}=29400$ l/mol/L/cm), segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989). A atividade enzimática foi expressa em Unidade Internacional (UI), que foi definida pela quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto para a β -glicosidase e 1 mmol de substrato por minuto para as peroxidases. A concentração total de proteínas foi medida pela metodologia de Bradford (1976), que avalia a adsorção do corante Comassie Brilliant Blue G-250 às proteínas em solução a 595 nm. A concentração de proteínas foi expressa em μ g/mL. Os resultados desse

experimento embasaram a escolha do fungo *Pleurotus ostreatus* para os experimentos seguintes.

4.7 Estimulação da produção de enzimas lignocelulolíticas

Para avaliar fatores que poderiam ter efeito sobre a produção das enzimas lignocelulolíticas, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^3 . Os fatores (variáveis) analisados foram: concentração de nitrogênio, concentração de farelo de trigo e pH, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental 2^3 com os níveis reais e codificados das variáveis.

Fatores	Níveis de variação	
	-1	+1
A) pH	3,5	5,0
B) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g/L)	0,75	1,0
C) Farelo de Trigo (g/L)	2	4

As oito combinações desse delineamento foram feitas em duplicata, totalizando 16 frascos. O meio utilizado foi o MNM que teve sua composição alterada conforme o delineamento experimental da Tabela 1. Frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio foram inoculados com 5 discos de micélio-ágar e incubados em incubadora a 25 ± 1 °C por 20 dias. Após esse período, a biomassa foi separada por filtração, seca a 60 °C por 2 dias e pesada. O filtrado foi utilizado para realização das análises enzimáticas (item 4.6) imediatamente após o término do experimento. Os resultados foram usados para definir algumas condições de cultivo no biorreator.

Os resultados foram analisados usando o software STATISTICA® 12.0.

4.8 Colonização do substrato de produção de cogumelos

Foram realizadas avaliações preliminares da capacidade de colonização do substrato de produção de cogumelos pelos inoculantes. A comparação foi feita entre o inoculante em alginato de *L. edodes*, produzido com o aditivo de farinha de trigo, e o inoculante tradicional produzido em grãos de trigo. O substrato comercial elaborado a partir de

serragem de eucalipto e o inoculante em grãos foram fornecidos pela empresa Fungi Brasilis e Vegetais Verdes. O substrato foi acondicionado em sacos esterilizáveis de 1 kg e com filtro para troca de gases. Os sacos foram esterilizados por 20 min a 121 °C e, após o resfriamento, foram inoculados em câmara de fluxo laminar. Dois sacos receberam o inoculante em alginato e outros dois sacos receberam o inoculante tradicional em grãos. A inoculação foi feita com volumes iguais medidos com auxílio de uma colher de sopa. Os sacos foram fechados com fita adesiva e mantidos em estufa a 25 °C, sem luz. O experimento foi mantido até que ocorresse a colonização completa do substrato que foi acompanhada visualmente e com a mensuração do crescimento linear, em cm, do fungo na superfície do substrato.

4.8.1 Comparação da colonização do substrato pelos diferentes inoculantes em alginato

Os inoculantes produzidos com os dois diferentes aditivos (farinha de trigo e serragem de eucalipto) foram utilizados para comparar a capacidade de colonização do substrato entre os tratamentos. Esse experimento também foi realizado em duplicata para cada tipo de inoculante e cada um deles recebeu 620 g de substrato. O volume utilizado para a inoculação foi de 10 mL de cápsulas/saco de substrato. Os procedimentos de esterilização, inoculação, incubação e avaliação do crescimento ocorreram conforme item anterior.

4.9 Construção do biorreator

Visando um equipamento relativamente (ao STR) simples e mais apropriado para o cultivo de fungos filamentosos, em parceria com o Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foi desenvolvido um biorreator de 5 litros de capacidade, construído em aço inox (Figura 5). A soldagem das peças realizada com sistema TIG e todas as conexões foram construídas também em aço inox, com as juntas rosqueadas vedadas com fita PTFE e as juntas planas seladas com *O-rings* de borracha, posicionados axialmente. O biorreator foi concebido para operar como coluna de bolhas e como *airlift* com circulação interna. Para operar como *airlift*, um tubo (*downcomer*) deve ser posicionado dentro do *riser*, e sua remoção é fácil para proceder a limpeza. Linhas de alimentação, retirada de amostras,

descarga de material, entrada de ar e vapor e saída de gases foram construídas com selos de vapor. As válvulas utilizadas foram do tipo esfera de $\varnothing = 6,4$ mm.

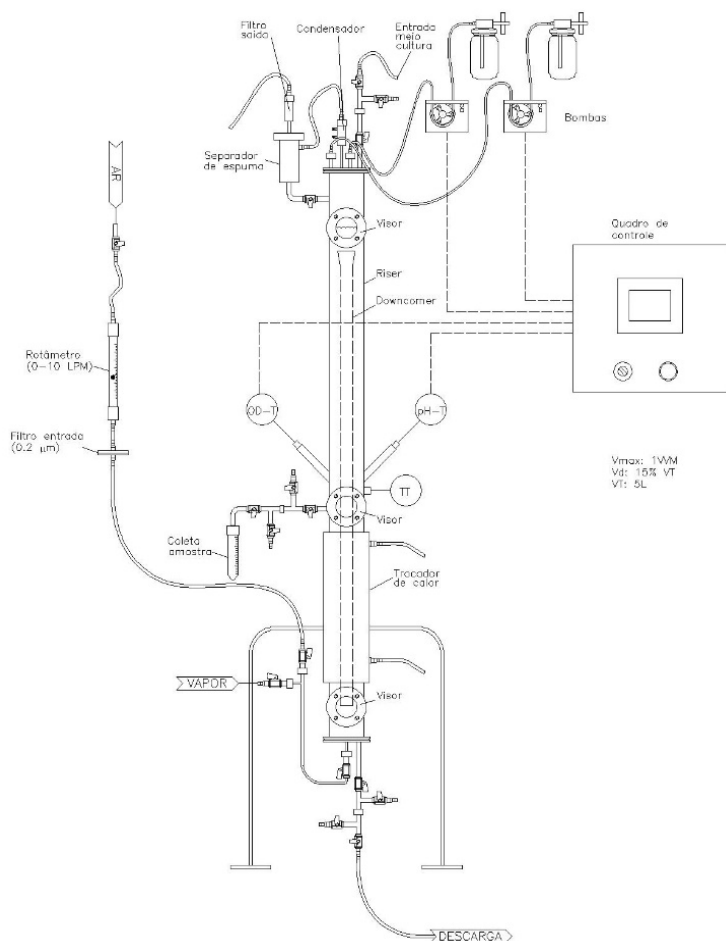


Figura 5. Biorreator *airlift* de 5 L com circulação interna.

Foram construídos três visores circulares, posicionados para observar o distribuidor de ar, os sensores de OD, pH e o duto de amostragem, e o separador de gás. Apesar de prejudicarem a circulação de líquido os visores são necessários para verificar as modificações fisiológicas no crescimento da cultura e a formação de espuma no topo do

biorreator. Para medidas de oxigênio dissolvido, foi instalado um sensor eletroquímico (amperométrico) esterilizável, modelo Oxyferm FDA ARC 120 (Hamilton Bonaduz AG), posicionado na metade da altura da coluna líquida. O sensor foi instalado numa porta inclinada a 45° devido à presença de eletrólito no corpo do sensor, com vedação realizada através de dois O-rings posicionados axial e radialmente, e com inserção mínima no *riser* de modo a não interferir na circulação do líquido. A calibração foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Para medidas de pH foi utilizado um sensor modelo EasyFerm Plus ARC 120, também fabricado pela Hamilton. Uma interface HMI (Delta Eletronics Inc.) foi utilizada para operar as leituras dos sensores e realizar o controle do pH utilizando duas bombas peristálticas com motores de passo para dosagem de ácido/base.

A saída dos gases foi protegida através de um cartucho com lã de vidro (0,10 g/cm³). Após a montagem, o biorreator foi submetido a testes de estanqueidade com pressões de 1,5 e 2 atm utilizando ar comprimido. Também foram realizados testes de esterilização e funcionamento durante 15 dias com meio de cultura não inoculado. Nesse período várias intervenções foram realizadas, como coleta de amostras, desligamento da aeração, variação na vazão de ar, e testes com o trocador de calor na manutenção da temperatura utilizando a circulação de água de um banho termostatzado. Após todos os testes, o biorreator foi submetido a uma caracterização hidrodinâmica e cultivos. As relações de medidas do biorreator estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de projeto utilizados na construção do biorreator *airlift*

Parâmetro	un	valor
Diâmetro interno do <i>riser</i> (D)	mm	85
Diâmetro interno do <i>downcomer</i>	mm	36
Altura do <i>riser</i> (H)	cm	100
Altura do <i>downcomer</i>	cm	0,76
Razão altura/diâmetro (H/D)	-	1,18
Razão área <i>downcomer</i> / <i>riser</i>	-	0,22
Área do trocador de calor	cm ²	928
Posição do sensor de pH	-	½ H
Posição do sensor de OD	-	½ H
Posição do amostrador	-	½ H
Volume do separador de gás	L	0,68
Volume <i>downcomer</i>	L	0,77
Volume <i>riser</i>	L	4,23
Volume útil	L	5,00

4.9.1 Estudos hidrodinâmicos

Na caracterização hidrodinâmica do biorreator foi utilizada uma solução de 0,15 mol/L de NaCl para simular o meio de cultura e uma condição de fluido Newtoniano, e uma faixa de vazão específica de ar de 0,2 a 1,00 vvm. A vazão do ar foi medida utilizando um rotâmetro com faixa de medição de 1 a 10 L/min, modelo MMA-23 da Dwyer Instruments, Inc., USA.

4.9.2 *Holdup* do gás

O *holdup* do gás foi determinado através do método da expansão do volume (CHISTI, 1989), onde se utiliza a medida da altura da coluna de líquido estático no biorreator e da altura da dispersão gás-líquido sob aeração para determinar os volumes V_E e V_D . Esses volumes permitem determinar o *holdup* do gás com a seguinte equação:

$$\varepsilon = \frac{V_E}{V_D} \quad (1)$$

onde: ε = *holdup* do gás (-); V_E = aumento do volume de líquido pela expansão do gás (L); V_D = volume da dispersão gás-líquido (L).

Esse método não permite a determinação do *holdup* do gás individualmente no *riser* e no *downcomer*. Neste trabalho somente foi determinado o *holdup* do gás total, que é equivalente ao *holdup* do gás no *riser* quando a eficiência do separador de gás for alta.

4.9.3 Velocidade de circulação de líquido

A circulação do líquido em biorreatores *airlift* é devida à diferença de densidade do fluido entre o *riser* e o *downcomer*. O fluido circula ao longo de um caminho bem definido: subindo pelo *riser* e descendo pelo *downcomer*. A velocidade média de circulação (\bar{U}_{Lc}) é definida (BLENKE, 1979) como:

$$\bar{U}_{Lc} = \frac{x_c}{t_c} \quad (2)$$

onde: x_c = distância percorrida por um traçador durante uma circulação completa (m); t_c = tempo médio para uma circulação completa (s)

Técnicas utilizando traçadores têm sido utilizadas para determinar a velocidade média de circulação (BELLO, ROBINSON e MOO-YOUNG, 1984). Devido às variações de diâmetro entre o *riser* e o *downcomer*, os valores da velocidade superficial medida no *downcomer* (U_{Ld}) ou no *riser* (U_{Lr}) são mais expressivos, e o critério da continuidade pode ser utilizado para relacioná-las. Apesar de as técnicas que utilizam traçadores serem bastante precisas e relativamente simples (CHISTI, 1989), utilizou-se neste trabalho uma esfera com densidade de aproximadamente 1 g cm^{-3} (massa específica do líquido no *downcomer*), construída com poliestireno e massa epóxi, suspensa livremente no líquido. Nessa técnica, utilizada anteriormente por Kawase e Moo-Young (1986), foi medido o tempo necessário para a esfera percorrer a distância completa do *downcomer* para as diversas vazões de ar (1 a 5 L/min), obtendo-se assim a velocidade superficial do líquido no *downcomer* para cada vazão de ar, em três repetições. A Equação 3 foi utilizada para se obter a velocidade superficial do líquido no *riser*.

$$U_{Lr}A_r = U_{Ld}A_d \quad (3)$$

onde: A_r = área da seção transversal do *riser* (cm^2); A_d = área da seção transversal do *downcomer* (cm^2); U_{Lr} e U_{Ld} = velocidade do líquido no *riser* e *downcomer* (m/s), respectivamente.

4.9.4 Tempo de mistura

O tempo de mistura é definido como o tempo para o biorreator alcançar um novo estado estacionário, após uma mudança na alimentação. Existem vários métodos para determinar o tempo de mistura (FU, WU e LU, 2003), mas neste trabalho foi utilizada a técnica do calor, onde introduziu-se água quente no topo do biorreator para servir como traçador. Foram utilizados termômetros digitais idênticos para medir a temperatura no topo e na base do biorreator, registrando-se os valores simultaneamente dos dois termômetros, até o momento em que as temperaturas se igualaram, obtendo-se, assim, o tempo de mistura.

4.9.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Foi utilizado um método que utilizou apenas o sinal de resposta de um sensor imerso no líquido submetido à aeração, conhecido como método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Inicialmente, injetou-se gás carbônico no líquido para eliminar o O₂ dissolvido, até a sonda indicar o valor de corrente zero. A seguir, iniciou-se a aeração do líquido, nas condições desejadas para determinação do k_La (vazões específicas de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 vvm; temperatura de 22±1 °C), passando-se a registrar o sinal da sonda a cada 5 ou 10 s até o transmissor indicar o valor de até 70 % da saturação (o sensor foi previamente calibrado no líquido saturado de O₂). Com a posse desses dados, o k_La foi determinado através de um balanço de massa considerando-se o *riser*, onde o ar foi injetado e ocorreu o contato gás-líquido, e o *downcomer*, onde a fase gasosa foi desconsiderada. O balanço de massa para o oxigênio na fase líquida no *riser* resultou em (ROSSI, 2006):

$$\frac{dC}{dt} \left(1 - \frac{V_d}{V_r(1-\varepsilon)} \right) = k_La(C_s - C) \quad (4)$$

onde: V_r = volume do *riser* (L); V_d = volume do *downcomer* (L); t = tempo (h); k_La = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (1/h); C = concentração de oxigênio dissolvido (mgO₂/L); C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mgO₂/L); ε = *holdup* do gás (-).

Integrando-se a Equação 4, conhecendo-se as condições iniciais ($t = 0$; $C = 0$), tem-se:

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C_s} \right) = -zk_La \cdot t \quad (5)$$

sendo $z = [1 - V_d/V_r(1-\varepsilon)]^{-1}$, que é constante para cada vazão de operação. O termo z representa a perda de capacidade de transferência de oxigênio em função do volume do *downcomer* (cerca de 15% do volume total do biorreator) que não recebe o gás. Locando-se $\ln(1 - C/C_s)/z$ em função do tempo, a partir dos dados experimentais obtidos através do ensaio dinâmico, obtém-se uma reta cuja inclinação fornece o valor de k_La . A fração C/C_s é o próprio sinal do sensor calibrado no intervalo de 0 a 100 %, não necessitando do conhecimento da concentração de saturação (C_s). Esse ensaio para determinação de k_La foi utilizado sem a presença do

microrganismo, tendo importância para avaliar o desempenho do sistema de aeração e de diferentes tipos de biorreatores. Para essa fase preliminar de estudo desse biorreator, e também em função do sistema de medição de OD ter chegado já no final deste trabalho, impossibilitando um estudo mais aprofundado, não se considerou o tempo de atraso na resposta do sensor de OD.

4.10 Cultivo em biorreator

Os fungos foram cultivados no biorreator *airlift* com circulação interna, projetado pelo Prof. Márcio José Rossi principalmente para cultivo de fungos filamentosos. A inoculação do meio de cultura com 300 mL de suspensão miceliana (item 4.4) foi realizada em capela de fluxo laminar e a transferência do meio já inoculado para o biorreator foi realizada por meio de conexões com selo de vapor, que permite a total assepsia. Para que não ocorressem reações indesejadas durante a esterilização do meio de cultura, como a reação de Maillard por exemplo, a glicose foi esterilizada em frasco separado com 300 mL de água deionizada, descontada do volume total do meio de cultura, e adicionada ao meio no momento da inoculação. A esterilização de 4,5 L de meio de cultura foi em autoclave por 20 minutos a 121 °C.

A esterilização do biorreator foi realizada previamente pela injeção de vapor direto, proveniente de uma autoclave. A esterilização é feita inicialmente com a pressurização até a pressão de 1 kg/cm², seguido de abertura parcial de todas as portas, inclusive dos sensores previamente acoplados (mas não apertados ao ponto de selar a porta), de modo a permitir a sangria de vapor pelas entradas e saídas, garantindo a esterilização dos pontos mortos. Após 15 minutos as portas são fechadas e o biorreator passa por nova pressurização, permanecendo em esterilização por pelo menos mais 30 minutos. Uma válvula de segurança libera automaticamente o excesso de vapor, mantendo o fluxo de vapor pelo biorreator e a pressão constante. Previamente a esse processo, o filtro de ar de entrada, junto com a mangueira de conexão ao biorreator, e já esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C deve estar conectado ao biorreator. Após o fechamento da válvula de entrada de vapor, é imperativo que a válvula de saída de gases do topo do biorreator esteja aberta. Caso contrário o forte vácuo gerado pela queda da temperatura (de forma brusca de 121 até 100 °C, e mais lentamente até temperatura do ambiente) pode danificar a estrutura do biorreator.

Após o resfriamento do biorreator, e meio de cultura inoculado transferido, iniciou-se a aeração com ar comprimido previamente umidificado numa vazão inicial de 0,20 vvm. O ar proveniente de uma linha de ar comprimido foi esterilizado por uma membrana filtrante de PTFE da Millipore®, com 50 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm . A vazão foi aumentada gradativamente e manualmente ao longo do tempo de cultivo até atingir 1 vvm. O controle da temperatura a 25 ± 1 °C foi realizada pela circulação de água de um banho termostatizado pelo trocador de calor do biorreator. O controle do pH foi feito pela injeção de NaOH/H₂SO₄ 0,2 mol/L para manter os valores de referência definidos para o cultivo.

O farelo de trigo foi adicionado em forma de solução em 200 mL de água destilada após 48 horas do início do cultivo. Ele foi previamente esterilizado por 20 min a 121 °C. Amostras de 45 mL foram retiradas a tempos variáveis, de acordo com o progresso do cultivo. As amostras foram separadas por filtração (papel Whatman n° 1) em duas frações, uma de 40 mL que foi congelada para posterior análise da biomassa, EPS, pH e glicose residual. A outra fração de 5 mL foi armazenada em glicerol a 25 % (v:v) para análises enzimáticas e qualitativa de EPS. O cultivo foi conduzido até a exaustão da glicose do meio.

4.10.1 Determinações analíticas

A determinação da concentração de biomassa nas amostras foi determinada pela secagem da biomassa a 60 °C até peso constante, e o volume da amostra. O filtrado livre de biomassa foi utilizado para extração de EPS. Essa extração foi feita com etanol 96° GL na proporção de 1:3 (v de filtrado:v de etanol) e o líquido foi centrifugado por 10 min a 1100 g. O precipitado também foi seco a 60 °C até peso constante. O pH foi medido por um pHmetro de bancada e a glicose residual foi determinada com o analisador bioquímico YSI 2700 Select (YSI Corporated).

Com as amostras de 5 mL armazenadas em glicerol foram realizadas as análises enzimáticas de acordo com o item 4.6, a fim de verificar sua variação ao longo do cultivo. Para a análise qualitativa dos EPS, 1 mL da amostra foi congelada para posterior análise por HPLC conforme metodologia de Camelini et al. (2012).

4.10.2 Determinação das grandezas de transformação

Para acompanhar a evolução de um cultivo, é importante que as grandezas de transformação sejam obtidas, em especial as específicas que levam em consideração a biomassa no processo no instante de sua determinação. A medição e comparação dessas grandezas específicas permite uma interpretação correta quando há a necessidade de comparação entre diferentes tratamentos. Medidas de biomassa, substrato residual ao longo do tempo de cultivo associadas a modelos de crescimento (Equação 6), coeficientes de rendimento (Equação 7) e balanços de massa (Equação 8), fornecerão dados fundamentais para a definição das melhores condições de processo (ROSSI, 2006; DUARTE FILHO, 2009).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X \quad (6)$$

$$\frac{dX}{-dS} = Y_{X/S} \quad (7)$$

$$\frac{dC}{dt} = z \cdot k_L a (C_s - C) - OUR \cdot X \quad (8)$$

onde: X = concentração de biomassa (g/L); S = concentração de substrato (g/L); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em biomassa (g_X/g_S); μ_X = velocidade específica de crescimento celular (1/h); OUR = velocidade específica de consumo de oxigênio pelas células (*oxygen uptake rate*) (mgO₂/g_X/h).

A velocidade definida por unidade de concentração celular tem como dimensão [tempo⁻¹], desde que S e X estejam expressas em g/L. Na existência de uma fase exponencial de crescimento, μ_X é constante e apresenta seu valor máximo (μ_{Xmax}). Nessa condição, segundo a diferenciação e integração da Equação 6, tem-se:

$$\ln X = \ln X_{qi} + \mu_{Xmax} \cdot t \quad (9)$$

Então, locando-se $\ln X = f(t)$ obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é μ_{Xmax} . Como em cultivo de fungos filamentosos não ocorre uma

fase exatamente exponencial, devido às limitações de transferência de massa nos aglomerados de hifas ou *pellets*, os valores de velocidade obtidos através dessa metodologia foram considerados como médias dentro do intervalo onde os dados foram ajustados. Pode-se, também, obter o tempo de duplicação da biomassa, considerando-se $X = 2X_{0i}$ na Equação (9), o que resulta em:

$$t_{dup} = \frac{\ln 2}{\mu_{Xmax}} \quad (10)$$

onde: t_{dup} = tempo para duplicação da biomassa (d)

Com a Equação 10 e o conhecimento da velocidade específica de crescimento, pode-se prever a duração de um cultivo, conhecendo-se a concentração inicial de biomassa.

Desde que as condições não sejam alteradas significativamente ao longo do cultivo, $Y_{X/S}$ deve ser constante, e a integração da Equação 2 fornece a Equação 11.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (11)$$

Representando-se os dados em um gráfico $X=f(S)$, o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é $Y_{X/S}$. Esse fator de conversão de substrato em biomassa é uma grandeza estequiométrica importante. Assim, ela foi determinada preliminarmente para cultivos em frascos, auxiliando posteriormente na análise do cultivo em biorreator. No caso dos cultivos em frascos, esse coeficiente foi determinado considerando as informações do início e fim de cada cultivo (Equação 12)

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (12)$$

onde: X_f = concentração final de biomassa (g/L) e S_f = concentração de glicose residual (g/L)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivos preliminares em frascos aerados

Os cultivos em frascos aerados foram bem sucedidos, onde os fungos apresentaram crescimento nas condições de aeração forçada. A biomassa produzida se apresentou sob a forma de agregados micelianos de diferentes dimensões. Uma parte da biomassa ficou presa à pedra porosa e também às laterais do vidro, no limite da superfície líquido-ar. Isso se deve à característica dos fungos de aderirem a superfícies para que possam crescer. Também foi realizado um cultivo com 2 g/L de farinha de trigo adicionado ao meio de cultura, para que fosse possível uma verificar empiricamente suas características (viscosidade, aerabilidade e crescimento do fungo) com o meio sem aditivo. O MNM é um meio translúcido, de coloração amarelada e a adição da farinha de trigo tornou-o ligeiramente opaco e esbranquiçado. A visualização dos agregados micelianos ainda continuou sendo possível após o início do crescimento (Figura 6). Para o *P. ostreatus* var. *florida*, ocorreu uma contaminação, apontando uma das dificuldades em se trabalhar com aditivos não solúveis.

Mesmo com a aeração forçada, a farinha de trigo acabou por acumular-se na região do entorno da pedra porosa, ocasionando maior acúmulo de biomassa nesse local do que no cultivo sem esse aditivo. Por sua vez, o maior acúmulo de biomassa acabou por imobilizar mais partículas de farinha de trigo. Esse problema foi resolvido com uma leve agitação diária do frasco para desprendimento da biomassa e mistura da farinha. A presença das partículas de farinha de trigo também estimulou a formação de agregados micelianos misturados à elas, que circulavam livremente no líquido.

A biomassa proveniente dos cultivos dos tratamentos com farinha de trigo e sem esse aditivo de *L. edodes* foi fragmentada e veiculada em hidrogel de alginato de cálcio, com objetivo de avaliar a viabilidade e capacidade de colonização do substrato de produção de cogumelos. Uma pequena fração da biomassa foi plaqueada imediatamente após a fragmentação para verificar a viabilidade e pureza da cultura. Os resultados serão apresentados posteriormente.

Observando-se um inoculante tradicional e um inoculante preparado com micélio microfragmentado e encapsulado em hidrogel, pode-se deduzir que o primeiro apresenta maior potencial de colonização do substrato de produção de cogumelos, já que o grão colonizado ainda

possui nutrientes disponíveis, conferindo uma condição mais favorável ao início da colonização. Assim, a estratégia de utilizar a farinha de trigo de maneira que essa permaneça junto com o fungo após sua veiculação no hidrogel, tem como objetivo simular a condição existente no inoculante tradicional. Com as observações preliminares, também surgiu a ideia de utilizar o substrato (serragem) como aditivo no meio de cultura, com o objetivo de desenvolver um inoculante com uma condição mais próxima à encontrada pelo fungo quando de sua inoculação no substrato de produção de cogumelos. Essa nova estratégia pode conferir uma vantagem a esse inoculante na colonização inicial do substrato.



Figura 6. Cultivo aerado de *L. edodes* em condição submersa em meio MNM com adição de farinha de trigo (à esquerda) e meio MNM sem adição de farinha de trigo (à direita).

Os experimentos com os tratamentos meio MNM, meio MNM+farinha de trigo e MNM+serragem, foram realizados simultaneamente para os dois fungos modelo. Os resultados mostraram que todos os tratamentos foram adequados para produção de biomassa suficiente para o encapsulamento e posteriores testes de viabilidade. A produção visível de biomassa começou a ocorrer a partir do segundo dia de cultivo, pois o micélio recém fragmentado do fungo precisa se reparar antes de iniciar seu crescimento.

Assim como nos cultivos anteriores, foi observada a alteração de coloração do meio devido à presença dos aditivos, porém, sem interferência na visualização de biomassa. Também ocorreu a formação de agregados micelianos e *pellets* em torno das partículas presentes no

meio. Os *pellets* nos cultivos de *L. edodes* eram bem maiores do que aqueles nos cultivos de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Os cultivos contendo aditivos apresentaram maior acúmulo de biomassa e do próprio aditivo em torno da pedra porosa, o que dificultou um pouco a separação dos agregados quando os frascos eram agitados levemente. Para o *P. ostreatus* var. *florida*, no tratamento MNM+farinha de trigo, houve alteração de coloração na metade do cultivo, que passou de levemente esbranquiçado para alaranjado forte. Nenhuma outra alteração foi observada no meio e a produção de biomassa não foi interrompida. Ao final do cultivo, a observação de alguns *pellets* em microscópio mostrou que o cultivo não continha contaminantes. Ao final dos cultivos, a biomassa foi fragmentada e imobilizada em hidrogel de alginato de cálcio, para avaliação da viabilidade ao longo do tempo de armazenamento.

5.1.1 Determinação da conversão de substrato em biomassa

Na Tabela 3 estão apresentados os valores da conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) determinados para os cultivos de *P. ostreatus* var. *florida* e *L. edodes* em frascos aerados. Nesses cultivos foi feita uma comparação entre os dois fungos e, em outro cultivo do fungo *P. ostreatus* var. *florida*, comparou-se o rendimento em meio de cultura com farelo de trigo.

Tabela 3. Valores de $Y_{X/S}$ (g_X/g_S) obtidos para cultivos em frascos aerados após 15 dias (média de duas repetições).

	ΔX	ΔS	$Y_{X/S}$
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	0,79	3,2	0,25
<i>L. edodes</i>	0,85	3,5	0,24

O valor de biomassa obtido para o *L. edodes* foi cerca de 7 % maior que aquele para o *P. ostreatus* var. *florida*, porém, os valores de conversão para os dois fungos se mostraram bastante semelhantes e relativamente baixos. Rossi (2001) cultivando um fungo basidiomiceto e visando a produção de biomassa, obteve rendimentos entre 0,23 a 0,47 utilizando variações do meio MNM. A eficiência com que um micro-organismo transforma os nutrientes em biomassa depende de muitas variáveis, e pode ser aumentada com o melhoramento das condições de cultivo. O cultivo aerado em frascos estáticos permite basicamente o controle da

temperatura, e a produção de biomassa pode ser diminuída ou cessada caso ocorra algum fator limitante. Entretanto, o rendimento é um fator estequiométrico, não devendo ser diferente para condições de cultivo semelhantes. Observando o ΔS na Tabela 3 se constata que a glicose residual foi elevada e a produção de biomassa foi baixa (menor que 1 g/L). A razão principal provavelmente é a grande produção de ácidos pelos fungos, que fez com que o pH dos cultivos atingisse valores abaixo de 2,8, limitando seu crescimento. Outra possibilidade para a diminuição do pH do meio de cultura é a presença de amônia como fonte de nitrogênio. É possível que o íon NH_4^+ seja transportado para o interior do tecido fúngico em lugar de H^+ , causando uma diminuição mais rápida do pH do meio (DEACON, 2006).

No cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* com aditivo nutrienste, obteve-se rendimento de 1,09 ($\Delta X=2,99$, $\Delta S=2,75$ e $\text{pH}_f=2,79$). Um rendimento acima de 1,0 é incoerente, mas é porque o cálculo considera apenas a fonte de glicose como fonte de carbono, enquanto o fungo ainda tinha disponível extrato de malte e, diferente dos cultivos anteriores, também o farelo. A biomassa obtida com o farelo foi maior, indicando que o fungo foi capaz também de utilizá-lo como fonte de carbono.

Kawagoe et al. (2004) avaliaram a conversão de substrato em biomassa em diferentes cultivos de *Agaricus blazei* em um biorreator de coluna de bolhas. Os valores de rendimento encontrados nesse estudo variaram entre 0,68 e 1,10, sendo esse último bastante semelhante ao encontrado para o *P. ostreatus* var. *florida* no experimento com o farelo. Assim como nesse trabalho, apenas a concentração de glicose foi usada para o cálculo, mas os meios de cultura utilizados continham também peptona e extrato de levedura, que são fontes de carbono para o fungo. Já o trabalho realizado por Márquez-Rocha et al. (1999) com *P. ostreatus*, utilizou glicose e extrato de levedura como fontes de carbono e o rendimento obtido foi de 0,51, valor mais próximo ao máximo obtido por Rossi (2001). Uma maneira de se aferir mais precisamente o rendimento, é a utilização de metodologias que não considerem apenas a glicose como fonte de carbono, mas também os outros açúcares presentes no meio de cultura e que também são utilizados pelo metabolismo fúngico.

Outra alternativa para avaliar o rendimento é a medição da eficiência de conversão do substrato. Um critério bastante utilizado para esse fim é o coeficiente econômico, expresso em porcentagem, que leva em conta o peso seco da biomassa produzida pelo peso seco do substrato consumido. Os valores obtidos costumam girar entre 20 e 35 em um meio mais diluído, e tendem a baixar com o enriquecimento do meio. A importante conclusão à que se chega é de que boa parte do substrato

fornecido a um fungo é utilizada para a produção de energia, mas não de biomassa (DEACON, 2006).

5.2 Atividade de enzimas lignocelulolíticas

Além da capacidade de tolerar as condições de um cultivo aerado, fundamental para a produção em biorreator, e utilizando a estratégia de criar condições favoráveis à colonização do substrato, é importante avaliar não só a capacidade de produção, pelos fungos, de enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos em condições de cultivo submerso, mas também a atividade enzimática na condição diluída do meio de cultura. Caso contrário, o uso desses aditivos seria apenas mais uma dificuldade ao desenvolvimento do processo.

O crescimento miceliano observado nessas condições mínimas de cultivo indicou que a serragem funcionou como um indutor para a produção das enzimas de interesse, com consequente utilização da serragem para o crescimento fúngico. Diversos trabalhos relatam a capacidade que diferentes materiais lignocelulósicos adicionados ao cultivo, tem de estimular a produção de enzimas lignocelulolíticas pelos fungos. A produção e atividade enzimáticas são variáveis de acordo com o material utilizado e podem variar também de acordo com cepas da mesma espécie fúngica (ELISASHVILI et al., 2008)

Mesmo com pequena quantidade de biomassa inicial, os fungos apresentaram a capacidade de emitir suas hifas para o meio de cultura em direção às partículas de serragem e, após sete dias, todas as partículas de serragem encontravam-se imobilizadas pelas hifas. Após esse período em que as hifas cresceram envolvendo o substrato, teve início a formação de um tapete miceliano na superfície do meio de cultura (Figura 7). A biomassa produzida indica que ambos os fungos são capazes de utilizar o material lignocelulósico disperso no meio de cultura líquido como única fonte de carbono, como acontece no substrato sólido para produção de cogumelos. Para o controle sem fonte de carbono não foi observado crescimento.

As análises indicaram que a produção de proteínas solúveis entre os dois fungos foi semelhante, com valores de 107 µg/mL para o *L. edodes* e 109 µg/mL para o *P. ostreatus* var. *florida* (Figura 8). Isso indica não apenas a presença das enzimas no caldo de cultura, mas também a capacidade do fungo em crescer em um meio pobre em nutrientes.

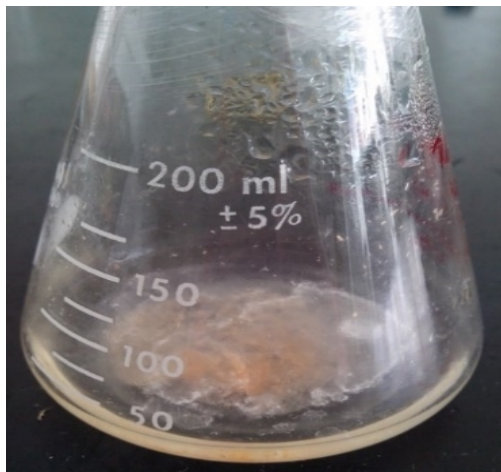


Figura 7. Micélio de *P. ostreatus* var. *florida* crescido em meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubado em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

A atividade de β -glicosidase foi maior para o *L. edodes*, (73,06 UI) do que para o *P. ostreatus* var. *florida* (61,88 UI) (Figura 9). Mas uma diferença significativa foi observada na atividade de peroxidase, onde o *P. ostreatus* var. *florida*, com 3,7 UI mostrou uma atividade cerca de onze vezes maior para essa enzima que o *L. edodes*, com 0,31 UI (Figura 10).

Embora a atividade de β -glicosidase tenha sido semelhante para os dois fungos, dados na literatura relatam que diferentes cepas de *L. edodes* mostram pouca ou nenhuma atividade para essa enzima, indicando que ele parece não ser um bom produtor (BUSWELL, CAI e CHANG, 1996; ELISASHVILI et al., 2008; CHICATTO et al., 2014). O estudo de Chicatto et al. (2014) verificou atividade para essa enzima em apenas uma de três cepas estudadas e com um valor bastante baixo, de 0,31 UI/L. De acordo com Leatham (1985), *L. edodes* é um fungo apenas moderadamente celulolítico, uma vez que foi capaz de degradar apenas 19 % da celulose presente no experimento realizado, além de baixa atividade dessa enzima, com valores abaixo de 1 UI/frasco. Nesse trabalho a atividade de β -glicosidase observada mostra que a utilização da serragem, para essa cepa, funciona como um bom indutor para a produção dessa enzima.

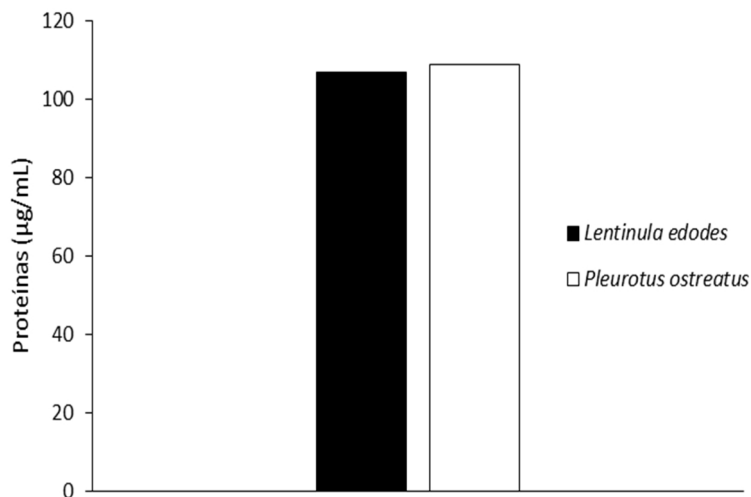


Figura 8. Concentração de proteínas totais de *L. edodes* e *P. ostreatus* var. *florida* cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições.

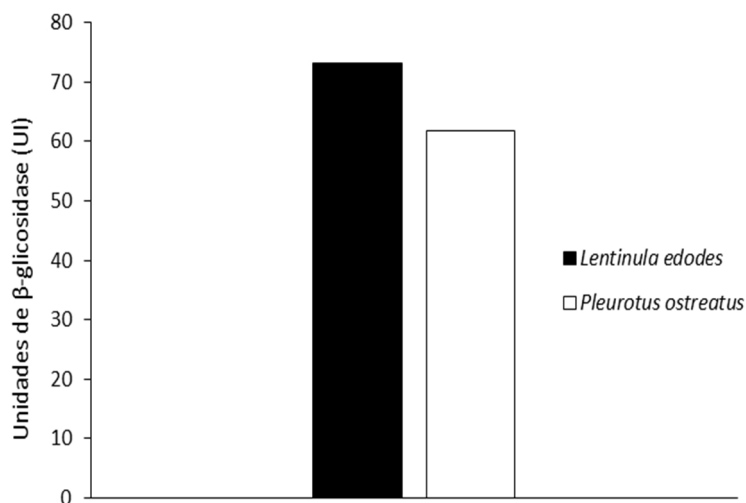


Figura 9. Atividade enzimática de β-glicosidase de *L. edodes* e *P. ostreatus* var. *florida* cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições.

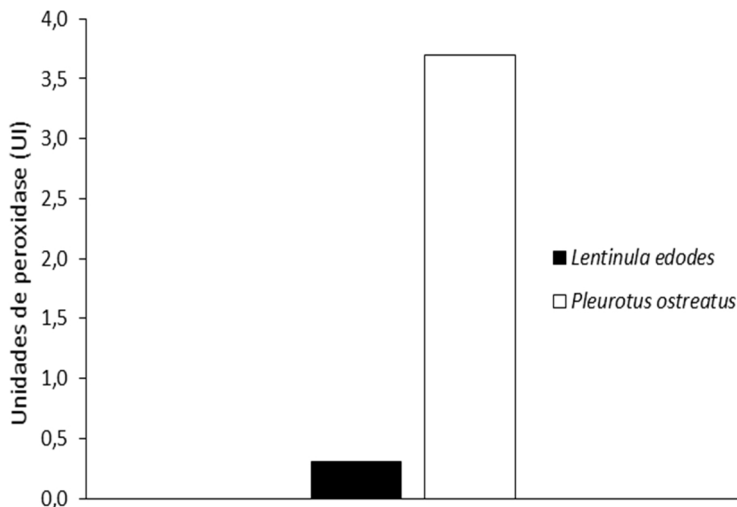


Figura 10. Atividade enzimática de peroxidases de *L. edodes* e *P. ostreatus* var. *florida* cultivados em frascos com meio MNM mínimo adicionado de serragem de eucalipto, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias. Média de três repetições.

A maior atividade de peroxidases pelo *P. ostreatus* var. *florida* indica que ele é um fungo mais robusto no que se refere à degradação de lignina. Essa alta atividade permite uma degradação bastante rápida desse substrato, eliminando compostos tóxicos do ambiente e facilitando a posterior utilização da celulose como substrato para o crescimento (PHILIPPOUSSIS et al., 2011). Esses resultados mostram que é possível a utilização de indutores, como a serragem, durante o cultivo fúngico, permitindo a elaboração de um inoculante que possa simular as qualidades do inoculante tradicional.

5.3 Estimulação da produção de enzimas lignocelulolíticas em *P. ostreatus* var. *florida*

A Tabela 4 demonstra os resultados do planejamento experimental fatorial completo 2^3 para avaliar os efeitos do pH, concentrações de farelo de trigo e nitrogênio na produção de enzimas lignocelulolíticas e proteínas. Os valores obtidos para as concentrações de β -glicosidase (em

$\mu\text{mol/L}$), peroxidases (em mmol/L) e proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de β -glicosidase, peroxidases e proteínas totais em função do pH e concentrações iniciais de farelo de trigo e fonte de N ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), após 20 dias de cultivo em frascos estáticos em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Exp.	Replicata	pH	N (g/L)	Farelo (g/L)	β -glicosidase ($\mu\text{mol/L}$)	Peroxidases (mmol/L)	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	3,5	0,75	2	10,92	13,78	19,77
2	1	5,0	0,75	2	10,59	8,23	23,30
3	1	3,5	1,00	2	14,86	13,57	25,66
4	1	5,0	1,00	2	8,70	14,76	24,91
5	1	3,5	0,75	4	9,30	30,95	31,89
6	1	5,0	0,75	4	10,27	26,09	23,21
7	1	3,5	1,00	4	9,62	30,61	27,17
8	1	5,0	1,00	4	8,27	22,45	26,42
9	2	3,5	0,75	2	9,95	13,67	21,89
10	2	5,0	0,75	2	10,27	10,54	27,17
11	2	3,5	1,00	2	14,16	11,43	28,68
12	2	5,0	1,00	2	10,27	12,96	25,85
13	2	3,5	0,75	4	12,27	31,70	33,02
14	2	5,0	0,75	4	10,92	25,17	27,92
15	2	3,5	1,00	4	9,95	33,44	34,72
16	2	5,0	1,00	4	8,70	27,55	24,91

Um gráfico apresentando as médias dos valores de β -glicosidase no eixo das ordenadas (Figura 11) mostra que a combinação do pH 3,5, farelo de trigo 2,0 g/L e nitrogênio 1,0 g/L é a mais eficiente para induzir a atividade desta enzima. O pH mais baixo também se mostra mais apropriado quando a concentração do farelo de trigo aumenta, mas com a menor quantidade de nitrogênio. O diagrama de Pareto (Figura 12) mostra que os fatores com efeito significativo (mas negativo) sobre a produção de β -glicosidase são o pH, a interação entre nitrogênio e farelo de trigo, a interação entre pH e nitrogênio e o farelo de trigo.

Os valores de β -glicosidase não tiveram uma variação muito grande entre os experimentos realizados. Essa é uma enzima responsável

pela degradação da celobiose em glicose, e sua produção é regulada pela velocidade com a qual o fungo é capaz de utilizar a glicose presente no meio (DEACON, 2006). Uma baixa concentração dessa enzima, associada à alta concentração de peroxidases, pode indicar que o fungo não esteja na sua velocidade máxima de crescimento no momento da amostragem, mas sim dando preferência à detoxificação de possíveis inibidores de seu crescimento, uma vez que as enzimas que participam da degradação da lignina são enzimas produzidas durante o metabolismo secundário do fungo, geralmente sob condições de limitação de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio (STAJIC et al., 2004; MIKIASHVILI et al., 2006). Outros trabalhos observaram que a adição de compostos aromáticos em meios com limitação de carbono e nitrogênio aumentou consideravelmente a indução de enzimas lignolíticas (MUÑOZ et al., 1997). O tipo da fonte de carbono e nitrogênio e a quantidade adicionada ao meio de cultura também interferem no padrão de produção das enzimas (MIKIASHVILI et al., 2006). Bettin et al. (2009) concluíram que caseína pura é uma melhor fonte de nitrogênio para a produção de lacases do que levedo de cerveja e proteína de soja e que sacarose pode ser utilizada como fonte de carbono para o mesmo fim.

Embora Chicatto et al. (2014) tenham encontrado um valor bem baixo para a atividade de β -glicosidase para *L. edodes* (0,31 UI/L), foi possível verificar que maiores valores de sulfato de amônia (como fonte de nitrogênio) no meio de cultura têm efeito negativo sobre a atividade dessa enzima e de outras celulasas. Os melhores valores para atividade enzimática foram obtidos nas maiores concentrações de bagaço de cana (como fonte de carbono) e menores concentrações de sulfato de amônia. É possível que o mesmo possa ser extrapolado para a atividade de β -glicosidase em *P. ostreatus*.

Aqui, o farelo de trigo constitui uma boa fonte de nitrogênio (relação C:N 9,8:1, CAMELINI, 2010), o que pode explicar a queda na atividade de β -glicosidase no meio contendo 4,0 g/L de farelo de trigo e 1,0 g/L de nitrogênio, tendo ocorrido o oposto para a atividade da peroxidase. O pico observado na atividade para a concentração 1,0 g/L de nitrogênio e 2,0 g/L de farelo de trigo indica que a relação C:N neste meio foi a mais adequada para a atividade desta enzima, indicando que o farelo de trigo é um bom indutor para essa enzima apenas quando adicionado em pequena quantidade. A obtenção de melhores valores de atividade para esta enzima passa pela busca de aditivos que possuam menor quantidade de nitrogênio em sua composição, buscando uma relação C:N mais benéfica para ela. Mas é importante ressaltar que o aditivo também deve induzir uma boa atividade de peroxidases, mantendo um equilíbrio

entre a indução de ambas as enzimas no fungo para que seja mantida a habilidade do inoculante em hidrogel em colonizar de maneira apropriada o substrato de produção de cogumelos.

Para as peroxidases, a maior concentração do farelo de trigo e o pH 3,5 determinaram concentrações médias mais altas, chegando a atingir mais que o dobro das concentrações obtidas com a menor concentração de farelo de trigo (Figura 13). A melhor condição para a atividade de peroxidases foi obtida com a combinação de 4,0 g/L de farelo de trigo, 1,0 g/L de nitrogênio e pH 3,5. O diagrama de Pareto (Figura 14) mostra que o farelo de trigo tem um efeito positivo bastante significativo sobre a atividade de peroxidases, já o pH possui um pequeno efeito negativo para essas enzimas, bem como a interação entre pH e farelo de trigo. No trabalho realizado por Mikiashvili et al. (2006) as fontes de nitrogênio que resultaram em maior atividade de peroxidases em *P. ostreatus* foram as fontes orgânicas peptona, caseína hidrolisada e xarope de milho. A atividade de peroxidases variou entre 0,4 U e 8,5 U para as fontes inorgânicas e entre 10,07 U e 71,1 U para as fontes orgânicas de nitrogênio.

A maior atividade de peroxidases com a maior concentração de farelo, uma fonte orgânica de nitrogênio, ocorre porque essa enzima tem um papel importante na resposta a estresses ambientais. A presença dos polímeros recalcitrantes no meio de cultura, atuam como indutores dessas enzimas, que agem sobre esse material. Esses compostos necessitam ser degradados rapidamente, para que o fungo então possa crescer sem a presença dos inibidores. A rápida degradação desses compostos acaba por liberar a celulose presente nesse material e que pode então ser utilizada como substrato pelo fungo, acelerando o seu crescimento (DEACON, 2006; PHILIPPOUSSIS et al., 2011).

Maior atividade lignolítica com enzimas peroxidases para espécies de *Pleurotus* foi encontrada em condições de cultivo mais ricas em nitrogênio, tanto para meios sintéticos com a adição de peptona, como para meios contendo substratos naturais (KNOP, YARDEN e HADAR, 2015). A adição do farelo de trigo ao meio de cultura aumentou consideravelmente a atividade observada de peroxidases, corroborando os resultados da literatura. O trabalho realizado por Fernández-Fueyo et al. (2014), avaliando a expressão dos nove genes para peroxidases lignolíticas de *Pleurotus ostreatus* em diferentes pH observou que a maior atividade enzimática foi obtida em pH 5,5, com queda em pH 3,0, diferente do observado aqui. Essa grande quantidade de genes pertencentes à família peroxidase sugere a possível existência de uma regulação diferencial para a expressão de cada uma delas, além de

provável redundância e/ou diversidade nas suas propriedades, possibilitando que esse fungo tenha bastante sucesso na colonização de substratos contendo lignina (KNOP, YARDEN e HADAR, 2015).

Entretanto, é importante notar que para *Phanerochaete chrysosporium*, o fungo mais estudado com relação à degradação de lignina, o estímulo à produção de enzimas lignocelulolíticas está relacionado à escassez de nitrogênio e é possível que o mesmo aconteça com outros fungos degradadores de lignina (DEACON, 2006). Esse fato pode explicar o aparecimento tardio, no ambiente, dos fungos da podridão-branca, que iniciam a colonização após outros fungos já terem utilizado grande parte do nitrogênio disponível.

A resposta para proteínas totais mostra que a maior produção ocorre com a maior concentração de nitrogênio em todos os casos, exceto para a combinação pH 3,5, 4,0 g/L de farelo de trigo e 1,0 g/L de nitrogênio, quando a produção é mais baixa quando comparada ao valor utilizando 0,75 g/L de nitrogênio. Em pH 5,0 praticamente não há diferenças na produção de proteínas para as variações nas concentrações de farelo de trigo e nitrogênio (Figura 15). O gráfico de Pareto (Figura 16) mostra que o farelo de trigo tem um efeito positivo significativo sobre a produção de proteínas, mas a interação entre o pH e o farelo de trigo tem um efeito negativo. O aumento na produção de proteínas para a concentração mais alta de farelo de trigo pode ser explicada tanto pelo aumento na produção de peroxidases quanto pela possibilidade de que tenha ocorrido maior produção de biomassa. O crescimento fúngico costuma ser limitado pela disponibilidade de nitrogênio no substrato (STAJIC et al., 2004). Quando não há mais nitrogênio disponível, o crescimento cessa e após algum tempo as hifas começam a morrer e o fungo então é capaz de reaproveitar o nitrogênio dessas hifas para restabelecer o crescimento (DEACON, 2006). O farelo de trigo fornece mais nitrogênio, permitindo que o fungo consiga crescer por mais tempo, produzindo mais biomassa e também maior quantidade de proteínas. Como discutido anteriormente, a maior quantidade de farelo de trigo aumentou a atividade de peroxidases e é possível que além da atividade, tenha induzido maior produção dessas enzimas, que resulta em valores mais altos de proteínas solúveis.

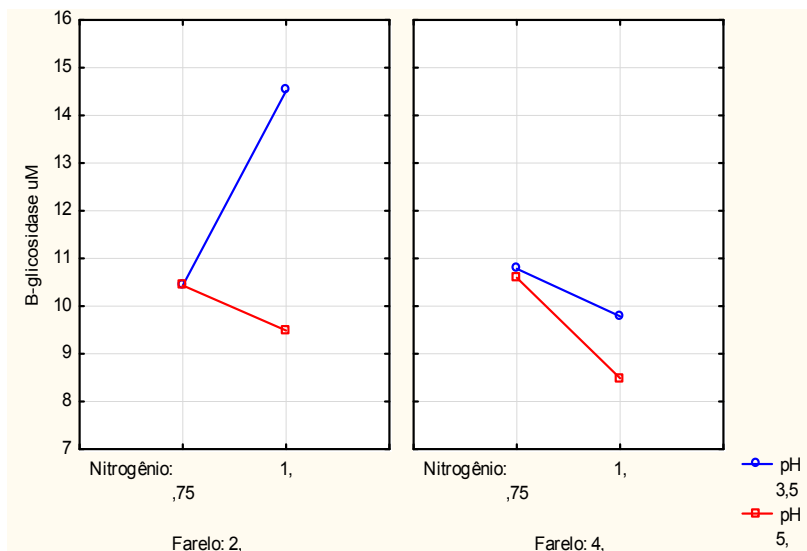


Figura 11. Gráfico das médias de concentração de β -glicosidase ($\mu\text{mol/L}$) de *P. ostreatus* var. *florida* cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

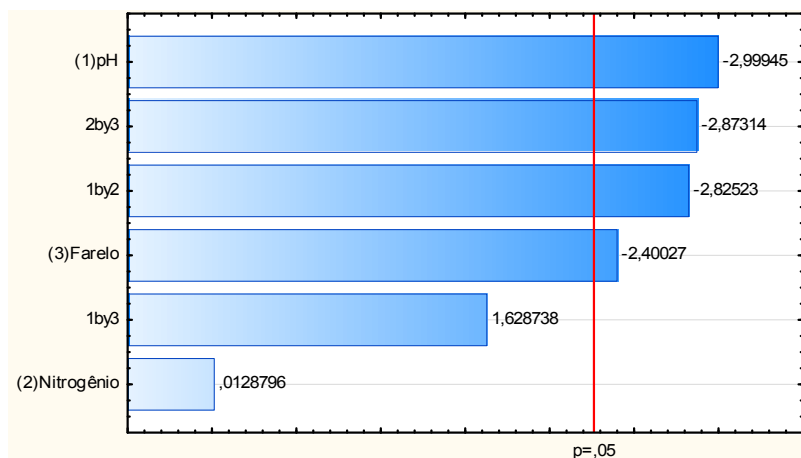


Figura 12. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de β -glicosidase de *P. ostreatus* var. *florida*, cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

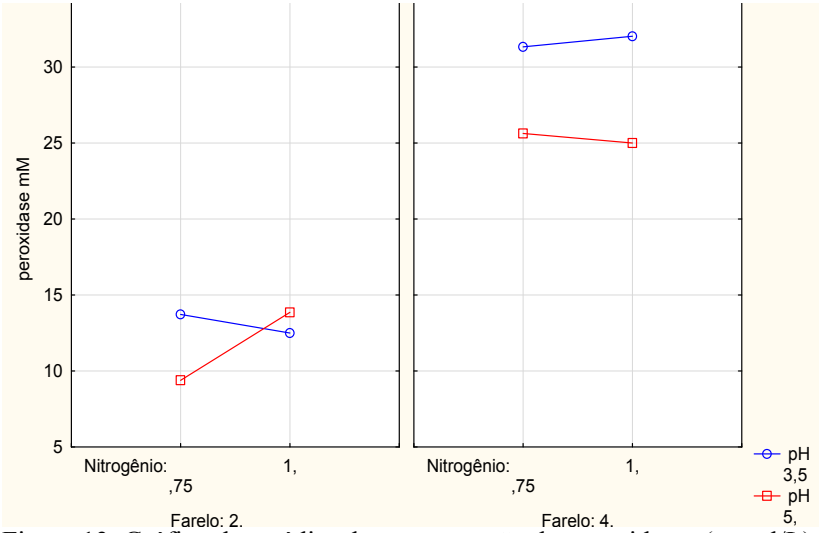


Figura 13. Gráfico das médias de concentração de peroxidases (mmol/L), de *P. ostreatus* var. *florida* cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

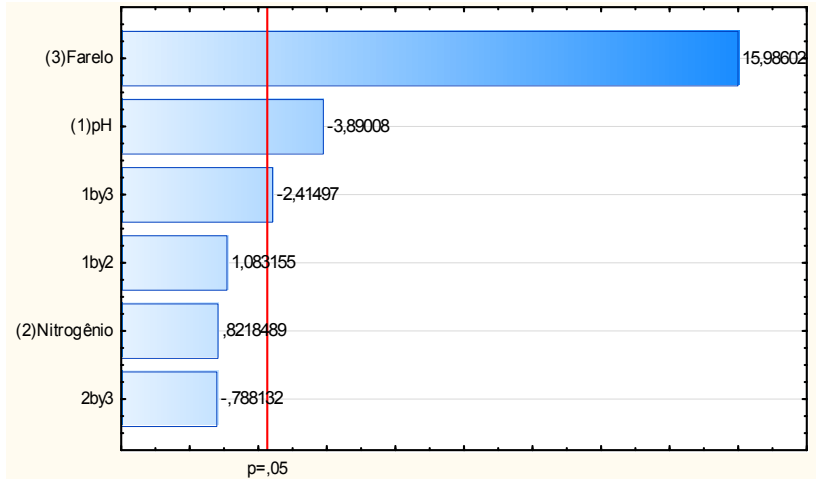


Figura 14. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de peroxidases de *P. ostreatus* var. *florida*, cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

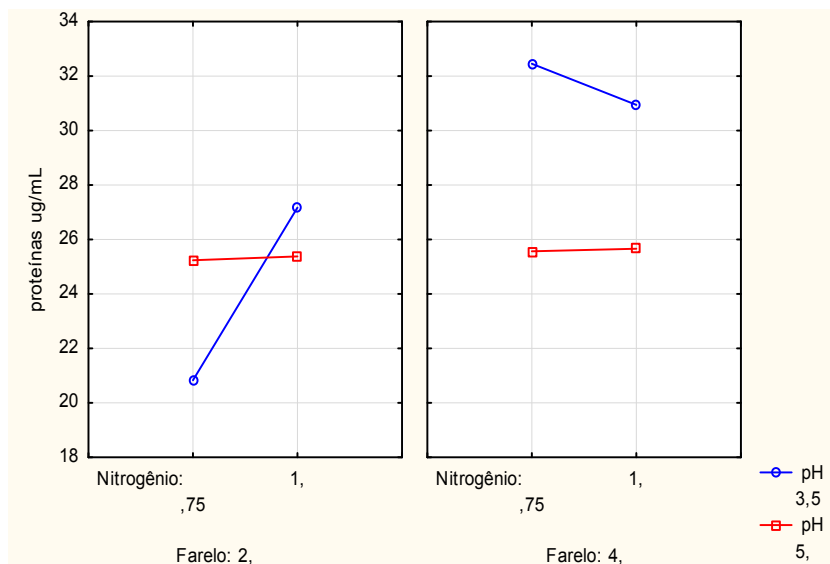


Figura 15. Gráfico das médias de concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), de *P. ostreatus* var. *florida* cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

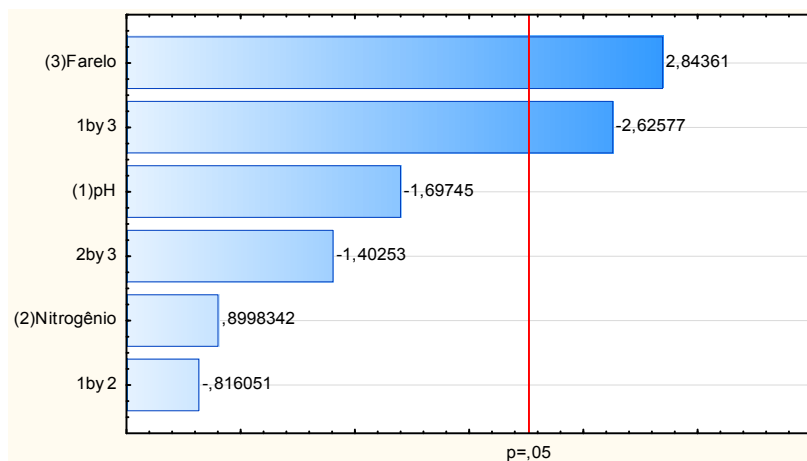


Figura 16. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis na concentração de proteínas de *P. ostreatus* var. *florida*, cultivado em frascos estáticos, considerando diferentes concentrações de nitrogênio, farelo de trigo e valores de pH, incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 20 dias.

Com base nesses resultados, os parâmetros para cultivo em biorreator foram definidos, usando 0,75 g/L de nitrogênio e 2,0 g/L de farelo de trigo. O pH de 3,5 é considerado muito baixo para a realização de um cultivo completo e pode ser bastante estressante para o fungo, por isso o valor de 4,5 foi utilizado. Embora o valor de 4,0 g/L de farelo de trigo tenha sido benéfico tanto para as peroxidases quanto para as proteínas, a quantidade total utilizada no biorreator seria de 20 g, o que poderia prejudicar a visualização da biomassa e a detecção da presença de contaminação.

5.4 Colonização do substrato de produção de cogumelos

Os inoculantes em alginato produzidos a partir dos cultivos com diferentes aditivos nutrientes apresentaram características semelhantes. As cápsulas obtidas apresentaram diâmetro aproximado de 5 mm e homogêneas em forma esférica e tamanho. A presença dos aditivos não interferiu na confecção das cápsulas.

Preliminarmente (pois naquele momento nem todas as estratégias estavam definidas) foi feita a comparação entre a colonização do substrato pelo inoculante tradicional e o inoculante em alginato de *L. edodes* produzido com farinha de trigo como aditivo, a fim de avaliar o desempenho desse inoculante frente ao tradicional. Afinal, o maior propósito deste trabalho foi desenvolver um inoculante produzido através de um processo mais vantajoso, mas com as qualidades de colonização do substrato sólido que o inoculante tradicional tem. A Figura 17 mostra a comparação do crescimento linear entre os dois inoculantes, onde o tempo total para colonização do substrato foi parecido, com 46 dias para o inoculante tradicional e 49 dias para o inoculante em alginato. O tempo para colonização não foi muito diferente dos encontrados na literatura. A média de tempo esperada para a colonização pelo *L. edodes* costuma variar entre dois a três meses, dependendo das condições de cultivo (STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2004).

A maior diferença apresentada entre os dois inoculantes se deu no início da colonização, quando o fungo emite suas hifas a partir inoculante para o substrato. O inoculante tradicional rapidamente colonizou a superfície, para então iniciar o crescimento em direção à base do saco, e em sete dias já havia colonizado dois centímetros de substrato. Nas 24 horas seguintes à inoculação, as cápsulas do inoculante em alginato sofreram um processo de desidratação bastante intenso, que diminuiu seu tamanho e dificultou a emergência das hifas, fato responsável pelo atraso

no início da colonização. Os grãos de trigo, ao contrário, possuem uma película protetora e que impede a perda excessiva de água, mantendo a hidratação desses grãos, além das hifas já estarem na superfície. Aos sete dias era possível observar a viabilidade das cápsulas, porém, sem a colonização completa da superfície do substrato. O crescimento em direção à base foi visível a partir do 14º dia. Embora com o atraso no início da colonização pelas cápsulas, percebe-se nas curvas da Figura 17 que a velocidade de colonização pelo inoculante em alginato foi maior que o inoculante tradicional nos primeiros 30 dias, ficando mais pareado a partir do 34º dia.

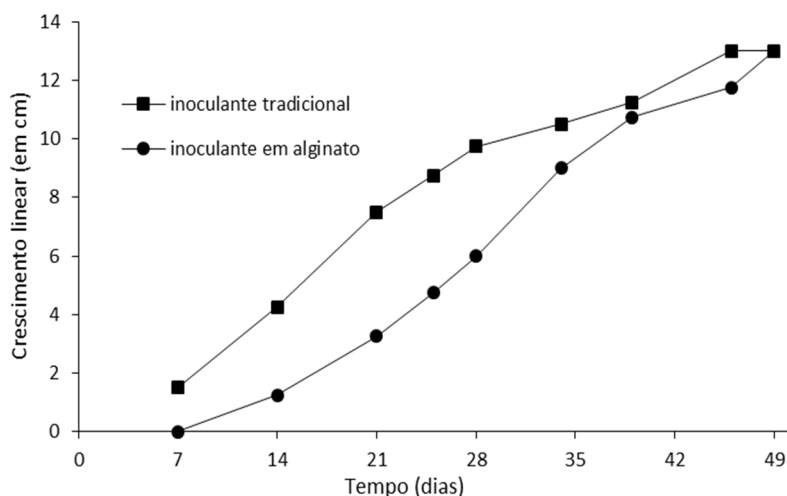


Figura 17. Crescimento linear do micélio de *L. edodes* em substrato de produção de cogumelos inoculado com o inoculante tradicional e com o inoculante em alginato, incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 50 dias.

Outra diferença que pôde ser observada foi a aparência do micélio durante seu crescimento. As hifas que emergiram dos grãos de trigo formaram uma camada de micélio branca e espessa na superfície, e por vários dias, o micélio crescido em direção à base tinha essa mesma característica. Com a maturação das hifas, esse micélio branco tornou-se amarronzado. O micélio emitido pelas cápsulas apresentou a coloração branca apenas na parte mais apical do micélio, com a mesma alteração de cor logo em seguida (Figura 18 A e B). Essa alteração de coloração indica diferentes estágios metabólicos do fungo (CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2005), e a mudança mais rápida para o tratamento com

as cápsulas pode estar relacionada à presença de amido residual nos grãos do inoculante tradicional, mesmo após a colonização completa do substrato. As cápsulas possuem apenas o material lignocelulósico em seu interior, sem uma reserva de nutrientes prontamente utilizáveis, obrigando o fungo a degradar de maneira mais acelerada o substrato onde está crescendo. Essa rapidez na mudança da aparência do micélio pode indicar uma melhor adaptação do fungo encapsulado para o processo de colonização do substrato.

Esse experimento foi considerado um sucesso, conferindo certa tranquilidade ao desenvolvimento desse processo, já que muitos outros fatores podem ser estudados, como a umidade do substrato, para aumentar a velocidade de colonização do inoculante em alginato. A estratégia de utilizar como aditivo a farinha de trigo foi uma evidente forma de simular o inoculante tradicional. Uma segunda estratégia foi a de utilizar a serragem (substrato para o inoculante tradicional), já que isso poderia permitir a formulação de um inoculante em alginato mais preparado enzimaticamente para a fase de produção de cogumelos.

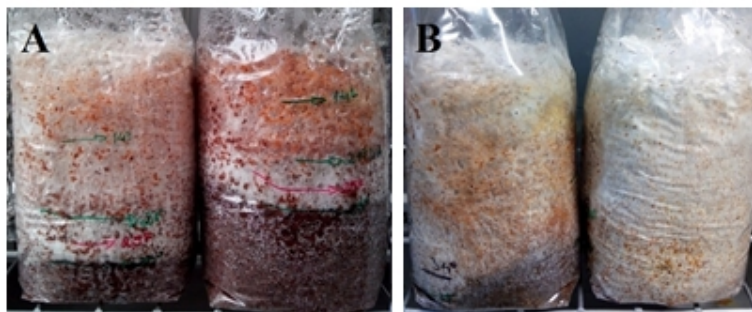


Figura 18. Crescimento miceliano linear de *L. edodes* em substrato de produção de cogumelos inoculado com inoculante tradicional (à esquerda) e com inoculante em alginato (à direita) no 28º dia (A), incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 50 dias. Comparação da aparência do micélio produzido pelo inoculante em alginato (à esquerda) e inoculante tradicional (à direita) (B).

5.4.2 Comparação da colonização do substrato pelos diferentes inoculantes em alginato

Nessa segunda fase de experimentos, um novo inoculante em alginato já estava desenvolvendo, em que foi utilizado como aditivo a

serragem de eucalipto (o mesmo substrato para produção de cogumelos). Esse experimento foi realizado quatro meses e meio após a produção do inoculante, condição que pode ser considerada inadequada quando se trata do inoculante tradicional. Apesar disso, a colonização do substrato foi apropriada para todos os tratamentos. A umidade do substrato verificada antes da esterilização foi de 70,77 % para o substrato de *P. ostreatus* var. *florida* e de 67,92 % para o de *L. edodes*, valores próximos aos recomendados na literatura (STAMETS e CHILTON, 1984; STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004). Apesar disso, foi verificada a desidratação das cápsulas de ambos os fungos, sendo mais intensa para os inoculantes de *L. edodes*. A umidade do substrato para esse fungo pode ser melhorada para diminuir o processo de desidratação que ocorre, mas evitando o excesso de umidade para que não ocorra contaminação. Embora não se saiba o quanto a desidratação das cápsulas afeta a emissão das hifas, o cuidado com a umidade do substrato e a utilização de algum agente umectante na formulação das cápsulas poderá conferir uma melhor condição de crescimento inicial aos fungos.

Mesmo sofrendo a desidratação, as cápsulas do inoculante de *P. ostreatus* var. *florida* mostraram viabilidade nas primeiras 24 horas, tendo colonizado toda a superfície do substrato em três dias. O tempo total para colonização do substrato foi de 17 dias para o inoculante MNM+serragem e 18 dias para o inoculante MNM+farinha de trigo e MNM (Figura 19). A média de crescimento foi de 0,72 cm/dia para MNM+farinha de trigo e MNM e de 0,76 cm/dia para o MNM+serragem. Valores semelhantes a esses foram obtidos por Mondal et al. (2010), num estudo que avaliou diferentes formulações de substrato. O crescimento mais lento foi obtido em serragem (0,50 cm/dia) e o mais rápido em uma combinação de folhas de bananeira e palha de arroz (0,78 cm/dia), com tempo total de colonização variando entre 21 e 24,75 dias. A maior velocidade de crescimento neste caso parece estar relacionada à presença de alfa-celulose, hemicelulose e lignina presentes na combinação folhas de bananeira e palha de arroz. Sharma et al. (2013) encontraram uma variação entre 22 e 26 dias para a completa colonização do substrato, sendo esse último obtido para a colonização em serragem, como nesse trabalho. Uma relação positiva entre maior tempo de colonização (33 e 28 dias), maior densidade do micélio e eficiência biológica (61,04 % e 50,64 %) foi encontrada no trabalho realizado por Obodai, Cleland-Okine e Vowotor (2003). Uma possível explicação é que a maior densidade miceliana leva a uma melhor distribuição do micélio no substrato, e, consequentemente, melhor aproveitamento dos nutrientes, resultando em uma maior eficiência biológica.

Os tempos de colonização para as espécies de *Pleurotus* são bastante curtos, levando de três a quatro semanas, dependendo da espécie utilizada e das condições de cultivo. Essa característica faz do *Pleurotus* uma boa escolha para aqueles produtores que desejam um retorno de produção mais rápido, principalmente no início do negócio (STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2004). Os valores encontrados nesse trabalho estão dentro do esperado pela literatura, indicando que os inoculantes produzidos tem capacidade para colonizar o substrato dentro do tempo esperado pelos produtores. Embora o maior tempo de colonização tenha resultado em maior eficiência biológica no trabalho de Obodai, Cleland-Okine e Vowotor (2003), é importante salientar que maiores tempos para a colonização podem resultar na ocorrência de contaminações por micro-organismos competidores, ocasionando a perda do material e prejuízo para os produtores.

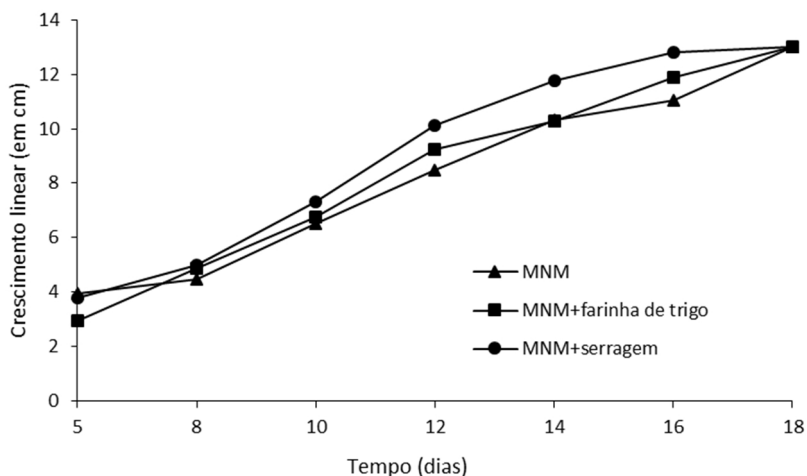


Figura 19. Crescimento miceliano linear de *P. ostreatus* var. *florida*, a partir de inoculantes em alginato produzidos em três meios de cultura diferentes, em substrato de produção de cogumelos, incubados em estufa a 25 ± 1 °C por 21 dias.

A aparência do micélio foi semelhante entre os três tratamentos durante todo o período de incubação (Figura 20). O micélio na superfície era branco e espesso, e a parte apical que crescia em direção à base tinha aparência branca (Figura 20 B e C), com a porção seguinte apresentando

coloração amarronzada. Após a colonização completa, o micélio tornou-se mais espesso e apresentou coloração branca (Figura 20 D).

Alguns dias após o término da colonização, primórdios formaram-se espontaneamente na superfície do substrato e os sacos foram então retirados da estufa de incubação e transferidos para uma sala mais fria (cerca de 22 °C) e iluminada. Cortes foram feitos nos sacos plásticos para que os primórdios pudessem crescer e o substrato foi mantido umidificado por meio de aspersão de água destilada. Trinta dias após a inoculação, foi observada a presença de grupamentos de primórdios saindo dos orifícios abertos e no 41º dia foi feita a primeira colheita dos corpos de frutificação, seguida de nova colheita no 42º dia (Figura 21). Os corpos de frutificação que se desenvolveram apresentaram tamanho grande e coloração cinza escuro quando pequenos e coloração cinza claro quando mais maduros.

Embora a obtenção de frutificações não tenha sido um objetivo deste trabalho, indica que além de colonizar propriamente o substrato, os inoculantes produzidos são capazes de produzir frutificações com as mesmas características daquelas comercializadas pelos produtores.

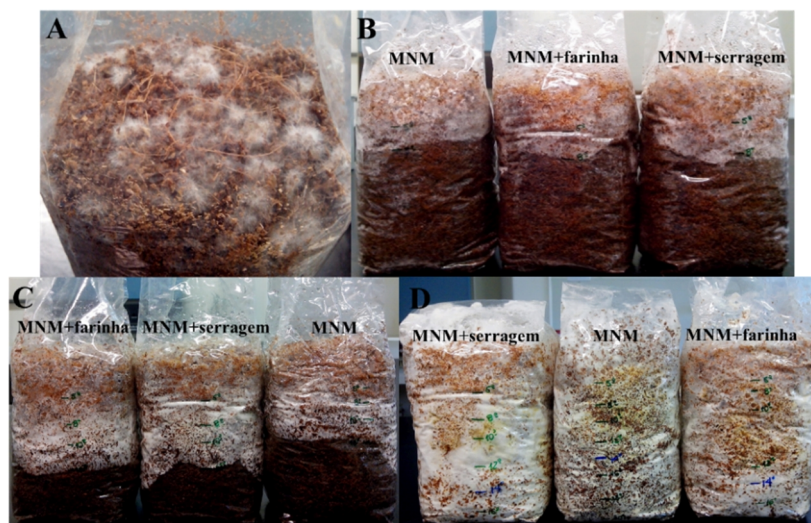


Figura 20. Colonização do substrato de produção de cogumelos pelos diferentes inoculantes em alginato de *P. ostreatus* var. *florida*, incubados em estufa a 25±1 °C por 21 dias. Superfície do substrato ao 2º dia (A); 8º dia (B); 12º dia (C); colonização completa (D).

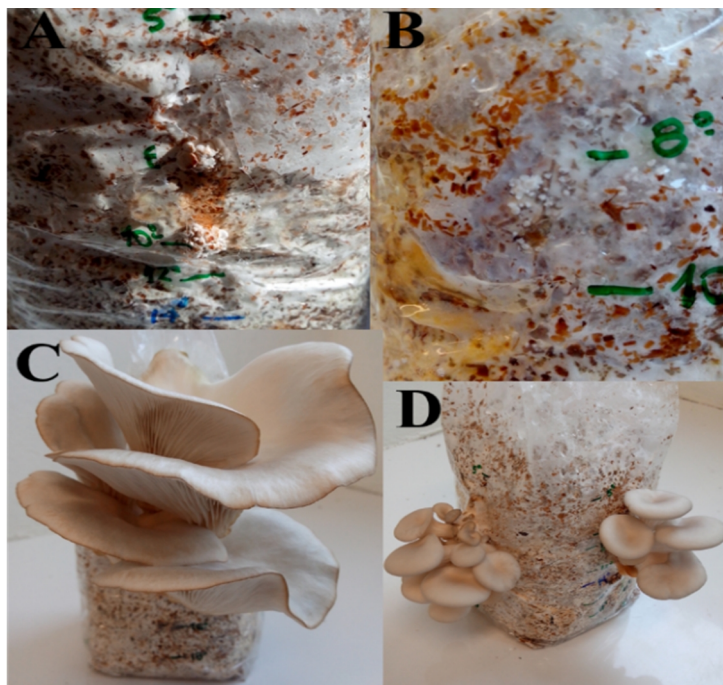


Figura 21. Formação de primórdios e frutificação de *P. ostreatus* var. *florida* em laboratório, mantidas em sala iluminada a 22 °C. Primórdios ao 36º dia após a inoculação (A) e (B); Frutificações no 41º dia após a inoculação (C) e (D).

As cápsulas do inoculante de *L. edodes* começaram a mostrar viabilidade nos primeiros dias após a inoculação, porém, a desidratação sofrida ocasionou dificuldade para a emergência das hifas. No 10º dia era possível observar o início da colonização do substrato pelas hifas, com todas as cápsulas viáveis. Houve diferença no grau de desidratação e no início da colonização da superfície entre os tratamentos. As cápsulas do inoculante MNM sofreram o maior grau de desidratação e mostraram maior lentidão para se recuperarem, iniciando a colonização no 12º dia. No início, as cápsulas dos tratamentos MNM+farinha de trigo e MNM+serragem formaram agregados antes de colonizar uniformemente a superfície, o que ocorreu três dias depois (Figura 22). Para esses dois tratamentos, foi possível iniciar a medição do crescimento linear no 20º dia e para o tratamento MNM apenas no 25º dia. O tempo total para colonização foi de 52 dias para o tratamento MNM+serragem, 55 dias

para MNM+farinha de trigo e 60 para MNM (Figura 23). A média de crescimento foi de 0,23 cm/dia, 0,22 cm/dia e 0,20 cm/dia, respectivamente.



Figura 22. Superfície do substrato de produção de cogumelos parcialmente colonizada pelo inoculante em alginato de *L. edodes* produzido em meio MNM+serragem ao 12º dia, incubado em estufa a 25 ± 1 °C.

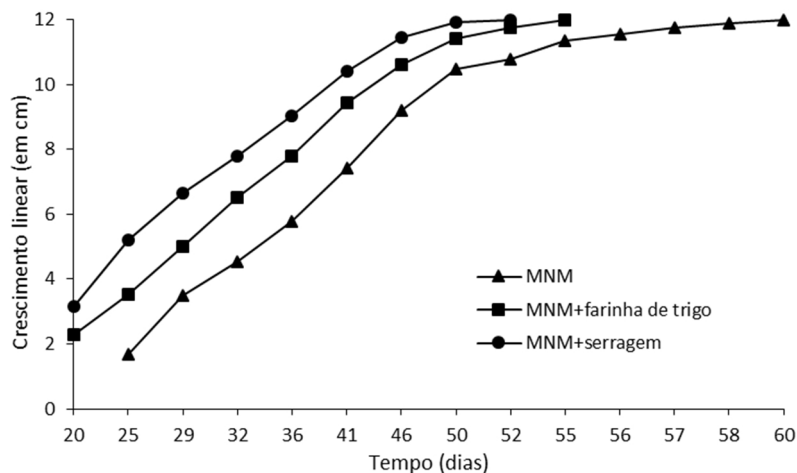


Figura 23. Crescimento miceliano linear em substrato de produção de cogumelos por inoculantes em alginato de *L. edodes* produzidos em três meios de cultura diferentes, incubados em estufa a 25 ± 1 °C, por 60 dias.

Desde o início do processo de colonização do substrato, foi possível observar uma diferença entre os tratamentos avaliados. O inoculante MNM+serragem foi o que cresceu mais rapidamente, mostrando que o fungo estava melhor preparado para a colonização desse substrato. É possível observar na Figura 24 A que ao 43º dia, o tratamento MNM havia colonizado cerca de 50 % do substrato, enquanto os outros dois tratamentos estavam próximos de 75 %. A coloração do micélio foi semelhante para todos os tratamentos, do início até a finalização da colonização, sendo branca na parte apical e amarronzada na sua parte mais antiga durante o crescimento, tornando-se esbranquiçada ao fim da colonização (Figura 24 B).

O tempo de colonização esperado gira em torno de três meses para a maior parte das cepas, mas pode variar de um a oito meses, dependendo do substrato, cepa e condições de cultivo (STAMETS, 2000; CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2005). Nesse trabalho o tempo total para a colonização do substrato, pouco menos de dois meses, está dentro do esperado para os padrões comerciais e indica que o inoculante em alginato tem potencial para aplicação comercial. Ainda não é possível saber se esses sacos produzirão frutificações com características semelhantes às obtidas comercialmente, mas as condições ideais para a maturação do micélio e indução de frutificações serão oferecidas dentro do intervalo de tempo recomendado para o *L. edodes*. Após a finalização da colonização do substrato, é importante que o micélio passe por um período de maturação. Primeiramente, ocorre a formação de protuberâncias, potenciais primórdios de frutificação, no entanto, eles são abortados após alguns dias e tem início o período de pigmentação do micélio. A coloração marrom aparece nos locais onde ocorreu a formação das protuberâncias e se espalha para o restante do micélio. Conforme a mudança de coloração acontece, o micélio se torna mais duro e resistente, com aspecto coriáceo. É apenas após esse período de maturação que o estímulo à frutificação pode ser oferecido (CHANG e MILES, 2004; MUSHWORLD, 2005).

Royse (1985) observou que o maior tempo para a colonização do micélio (116 dias contra 58 dias) é um fator importante para a produção de maiores rendimentos nas frutificações. Os valores de eficiência biológica chegaram a 70,6 % para 116 dias contra 18,8 % para 58 dias. Ele aponta que maior quantidade de biomassa, altos níveis enzimáticos e aumento na solubilidade dos nutrientes podem explicar os resultados obtidos. Philippoussis et al. (2011) relatou uma variação entre 28 e 40 dias para colonização do substrato por *L. edodes*, com uma relação positiva entre o maior tempo de colonização (40 dias) e maior produção de

biomassa, com valores que variaram entre 215,22 mg/g de substrato seco e 510,28 mg/g para as diferentes cepas estudadas.

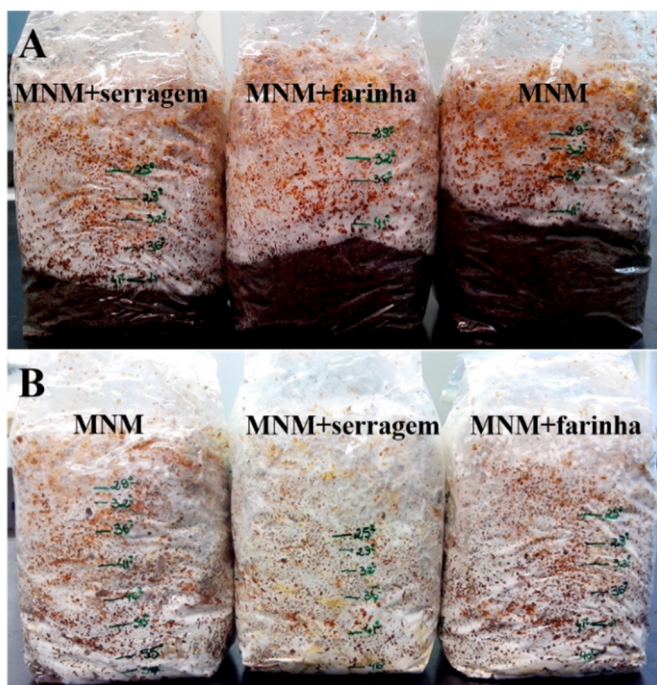


Figura 24. Colonização do substrato de produção de cogumelos pelos diferentes inoculantes em alginato de *L. edodes*, ao 43º dia (A) e ao 60º dia (B), incubados em estufa a 25 ± 1 °C.

O micélio de *L. edodes* cresce de maneira lenta, produzindo um micélio bastante denso e que geralmente está relacionado à uma alta atividade metabólica e melhor aproveitamento do substrato (MATA e SAVOIE, 1998; PHILIPPOUSSIS et al., 2011), fato que pode favorecer a obtenção de rendimentos maiores para frutificações. Entretanto, o sucesso do cultivo depende da combinação perfeita entre vigor do micélio e tempo de colonização, uma vez que um tempo muito longo para colonização pode resultar na presença de contaminações por micro-organismo antagonicos (PHILIPPOUSSIS, DIAMANTOPOULOU e ZERVAKIS, 2002).

O tempo de colonização parece estar diretamente relacionado ao conteúdo de hemicelulose no substrato, principalmente no início do

processo de colonização, e que é degradada preferencialmente pelo fungo, atingindo alta atividade metabólica, com a degradação de lignina ocorrendo algumas semanas após o início da colonização (LEATHAM, 1985; BUSWELL, CAI e CHANG, 1996; PHILIPPOUSSIS et al., 2011). Essa alta atividade metabólica e a capacidade de produzir fenol oxidases (lacases) também parecem estar relacionadas à capacidade das cepas de *L. edodes* em resistir a ataques e limitar o crescimento de micro-organismos competidores, como *Trichoderma* spp.. Mata et al. (1998) e Savoie et al. (2000) observaram que a adição de componentes ricos em lignina e fenóis ao inoculante tradicional utilizado, reduziu em 75 % a ocorrência de contaminações no substrato. A adição desses compostos induziu o sistema de defesa do fungo, permitindo que, frente à um antagonista, a resposta fosse mais rápida.

A utilização de serragem como aditivo ao inoculante em alginato produzido nesse trabalho pode não apenas ter preparado o *L. edodes* para uma melhor adaptação ao substrato, mas também à uma maior resistência a possíveis antagonistas, o que mostra seu potencial na aplicação na produção de inoculantes em alginato. O uso de aditivos foi claramente mais importante para o *L. edodes*, que apresentou melhor colonização do que o inoculante sem aditivos. O mesmo não pode ser dito para o *P. ostreatus* var. *florida*, que apresentou tempos de colonização muito semelhantes entre todos os tratamentos, indicando que o uso de aditivos pode ser dispensado para essa espécie.

Stamets (2000) recomenda o uso de 3 % a 7 % de inoculante por substrato obtido comercialmente, mas recomenda o aumento dessa porcentagem para 8 % a 15 % quando o inoculante é produzido pelo próprio produtor de cogumelos. A quantidade utilizada neste trabalho foi de cerca de 2 %, abaixo do recomendado. Para o *P. ostreatus* var. *florida*, esse valor pareceu não interferir na rapidez de colonização do substrato, mas os resultados obtidos para o *L. edodes*, principalmente com relação ao início da colonização, indicam a possibilidade do aumento da porcentagem de inoculante utilizado. Outro fator bastante importante para a rapidez da colonização do substrato é a distribuição do inoculante de maneira homogênea, obtida a partir da homogeneização do saco para que inoculante e substrato se misturem adequadamente (STAMETS e CHILTON, 1984; STAMETS, 2000). Para os fins da avaliação da velocidade de crescimento existe a necessidade de que o inoculante fique contido à camada superficial, o que pode interferir de maneira negativa no tempo total de colonização.

Os resultados aqui obtidos se mostram bastante promissores para a utilização dos inoculantes de hidrogel de alginato de cálcio para a

produção comercial de cogumelos comestíveis. Isso possibilita que a produção seja mais tecnológica e com maior controle no processo.

5.5 Viabilidade dos inoculantes em alginato em relação ao tempo de armazenamento

5.5.1 Estudos preliminares

Dois inoculantes em alginato foram produzidos a partir dos cultivos preliminares de *L. edodes*, um com farinha de trigo e outro sem farinha de trigo. Devido ao pequeno volume produzido, o primeiro teve sua viabilidade testada por até cinco meses (oito amostragens), pois uma parte foi utilizada para o teste de colonização de substrato logo após a produção do inoculante. O segundo teve sua viabilidade testada durante sete meses (onze amostragens).

Durante o período de amostragem, os inoculantes apresentaram 100% de viabilidade, porém, o tempo para emergência total das hifas foi aumentando conforme aumentou o tempo de armazenamento. Nas três primeiras amostragens (semanas 1 a 7), para os dois inoculantes, a emergência das hifas se deu em dois dias. Para as cápsulas com farinha de trigo, a emergência total das hifas se deu em três dias a partir da quarta amostragem (semana 10), aumentando para quatro dias nas amostragens de seis a oito (semanas 16 a 22). Para as cápsulas sem farinha de trigo, a partir da quarta amostragem foi observada maior lentidão para a emergência das hifas, que levou cerca de quatro dias entre as amostragens quatro e seis (semanas 10 a 16), aumentando para cinco dias (semana 19), sete dias (semanas 22 e 25) e finalmente para dez dias (semanas 28 e 31), como pode ser observado na Figura 25.

Esses resultados mostram que as cápsulas com farinha de trigo têm recuperação mais rápida após plaqueamento, quando comparadas às cápsulas sem esse aditivo. Isso provavelmente se deve ao fato de que a farinha de trigo fornece nutrientes ao fungo. A disparidade na recuperação é mais visível com o aumento no tempo de armazenamento, uma vez que aos cinco meses, o tempo necessário para a recuperação do inoculante sem farinha de trigo chega a ser quase o dobro do tempo para aquele com farinha de trigo. O armazenamento sob refrigeração não cessa o crescimento, apenas deixa-o mais lento e o fungo é capaz de utilizar o aditivo como reserva energética, possibilitando a recuperação mais rápida quando colocado em novo meio de cultura.

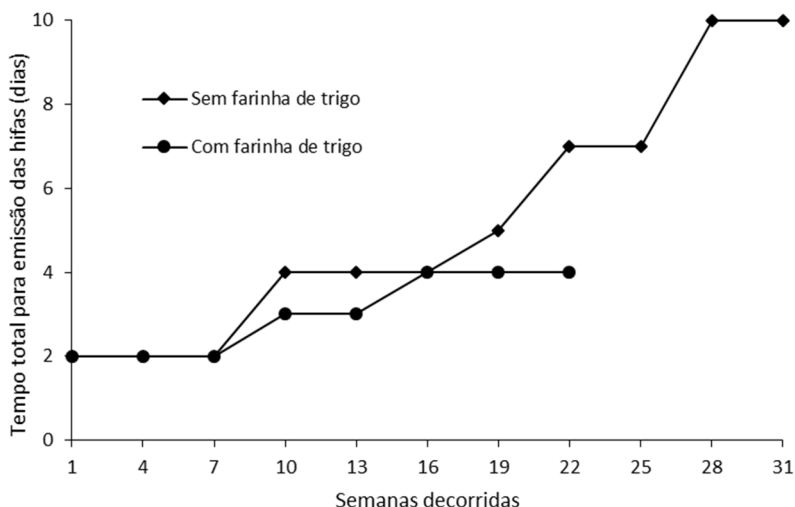


Figura 25. Viabilidade em relação ao tempo de armazenamento, sob refrigeração, de inoculantes de *L. edodes* produzidos em meio MNM suplementado ou não com farinha de trigo.

A viabilidade do inoculante de *L. edodes* sem farinha de trigo atende ao requisito de tempo mínimo de seis meses de viabilidade preconizado pela legislação brasileira para inoculantes agrícolas (ROSSI, 2006), mostrando que é possível a comercialização de um inoculante produzido com essa tecnologia para aplicação na produção de cogumelos. Embora não tenha sido possível observar a viabilidade do inoculante com farinha de trigo pelo período determinado, os resultados indicam que é provável que ele também mantivesse essa viabilidade, mantendo o padrão de recuperação mais rápida.

5.5.2 Viabilidade dos diferentes inoculantes em alginato

Até o presente momento, as amostragens indicam que os inoculantes de todos os tratamentos, para os dois fungos, apresentam 100 % de viabilidade, atendendo ao requisito mínimo exigido pela legislação brasileira para inoculantes agrícolas. As cápsulas de *P. ostreatus* var. *florida* apresentaram 100 % de viabilidade em até dois dias e, a partir desse momento, já foi possível observar o olho nu a emergência das hifas a partir da maior parte das cápsulas plaqueadas. Em comparação com o

inoculante em grãos, essa viabilidade se mostra bastante superior às relatadas e recomendadas para utilização comercial, que não chega a ultrapassar dois meses, sob condições refrigeradas (STAMETS, 2000). Esse aumento no período de manutenção da viabilidade, juntamente com a capacidade de boa colonização do substrato, aponta para o potencial da utilização no uso dessa tecnologia.

Para o inoculante de *L. edodes*, novamente observou-se diferenças com relação ao tempo de recuperação após o plaqueamento com o aumento no tempo de armazenamento (Figura 26). Para todos os tratamentos, nas duas primeiras amostragens (semanas 1 e 4), foi observada a viabilidade em 24 horas. A partir daí, o tempo para recuperação do inoculante MNM foi de dois dias (semanas 7 e 10), três dias (semana 13), quatro dias (semanas 16 e 19) e cinco dias até o final das amostragens. Os tratamentos MNM+farinha de trigo e MNM+serragem mantiveram o mesmo tempo para recuperação até a semana 13, com 24 horas (semanas 1, 4 e 7) e dois dias (10 e 13). Nas semanas 16, 19 e 22 a recuperação para o MNM+farinha de trigo foi de três dias passando para quatro até o final das amostragens. O inoculante MNM+serragem é o que possui a recuperação mais rápida, levando apenas três dias para expressar a viabilidade após os seis meses de armazenamento. (Figura 26). Outra diferença importante entre esses tratamentos é o vigor de crescimento. As cápsulas de MNM+serragem e MNM+farinha de trigo, após a emergência inicial das hifas, são capazes de colonizar a placa mais rapidamente quando mantidas em incubação, cerca de 15 dias. As cápsulas do tratamento MNM levam quase um mês para atingir o mesmo nível de colonização. Essa diferença no vigor pode ser explicada pela presença dos aditivos nas cápsulas, que fornecem nutrientes para que o fungo cresça mais rapidamente quando inoculado. A farinha de trigo e a serragem são capazes de manter o fungo ativo, estimulando a produção de enzimas lignocelulósicas, que degradam o substrato e liberam a glicose para uso do fungo.

As enzimas fúngicas são secretadas no meio de cultura, permanecendo em solução. Para que esse potencial enzimático do meio não fosse descartado, uma parcela de 100 mL para cada um dos cultivos foi mantida com a biomassa durante a fragmentação com solução salina. A presença das enzimas garante que o aditivo continuará sendo degradado, mesmo que lentamente, para utilização do fungo durante o período de armazenamento. Além disso, a presença do aditivo na cápsula continua a induzir a atividade e produção das enzimas responsáveis por sua degradação. Produzir mais enzimas, significa que os genes responsáveis pela sua expressão estão ainda ativos, mesmo que num nível

mais baixo. Dessa maneira, o fungo está melhor preparado para retomar esse processo de maneira mais acelerada quando da inoculação do substrato.

Os nutrientes presentes nos cereais do inoculante tradicional têm exatamente essa função, pois servem para impulsionar o fungo para um estado fisiológico melhor preparado a degradar o substrato de produção dos cogumelos (STAMETS, 2000). Enquanto o amido é degradado e fornece a energia necessária para o crescimento inicial do fungo, as fibras neles presentes funcionam como indutores de enzimas e, por consequência, indutores dos genes responsáveis pela expressão dessas enzimas (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2014). Entretanto, ao mesmo tempo em que a presença dos aditivos mantém o fungo ativo e num estado metabólico interessante, o seu crescimento excessivo pode acabar por gerar produtos metabólicos indesejados e que podem interferir com a viabilidade do inoculante. A condição de encapsulamento nesse caso pode ser limitante, pois o fungo não tem para onde crescer e escapar do acúmulo desses produtos metabólicos. Esse tipo de interferência ainda não foi observado para os fungos testados, tipo e quantidade de aditivos estudados neste trabalho, uma vez que não houve perda de viabilidade dos inoculantes em alginato.

Outro ponto importante a ser considerado com relação às enzimas é a sua estabilidade. O armazenamento pode interferir de maneira negativa, diminuindo o tempo em que permanecem ativas, diminuindo também a capacidade do fungo em se recuperar quando inoculado no substrato de cultivo. Outro fator que interfere nessa estabilidade é a presença de proteases produzidas pelo próprio fungo, que podem degradar as enzimas mais rapidamente do que elas são capazes de degradar o aditivo encapsulado ou do que novas proteínas possam ser produzidas. Uma alternativa para a ação das proteases é a inclusão de um inibidor de proteases fúngicas no momento do encapsulamento, com o objetivo de retardar a degradação das enzimas.

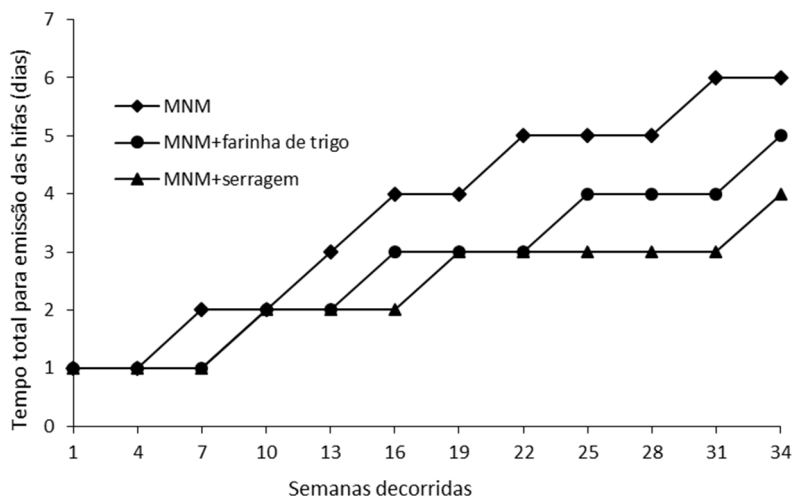


Figura 26. Viabilidade em relação ao tempo de armazenamento, sob refrigeração, de inoculantes em alginato de *L. edodes* produzidos em três meios de cultura diferentes.

5.6 Caracterização hidrodinâmica do biorreator

5.6.1 *Holdup* do gás e velocidade de circulação de líquido

A Figura 27 mostra o *holdup* do gás em função da vazão de ar para o biorreator operado nas duas formas possíveis (coluna de bolhas e *airlift* com circulação interna). Pode-se observar que os valores de *holdup* são praticamente iguais para as duas formas de operação, aumentando de forma tipicamente decrescente com o aumento da vazão. O aumento do *holdup* associado à turbulência, favorece a coalescência das bolhas, aumentando seu tamanho e velocidade de subida, e também a velocidade de circulação do líquido (no caso do modo *airlift*) (Figura 28). Isso por sua vez afeta o próprio *holdup*, sendo um padrão comumente observado nesses tipos de biorreatores (CHISTI e JAUREGUI-HAZA, 2002; MENG, HILL e DALAI, 2002; GOUVEIA, HOKKA e BADINO Jr., 2003; ROSSI, 2006).

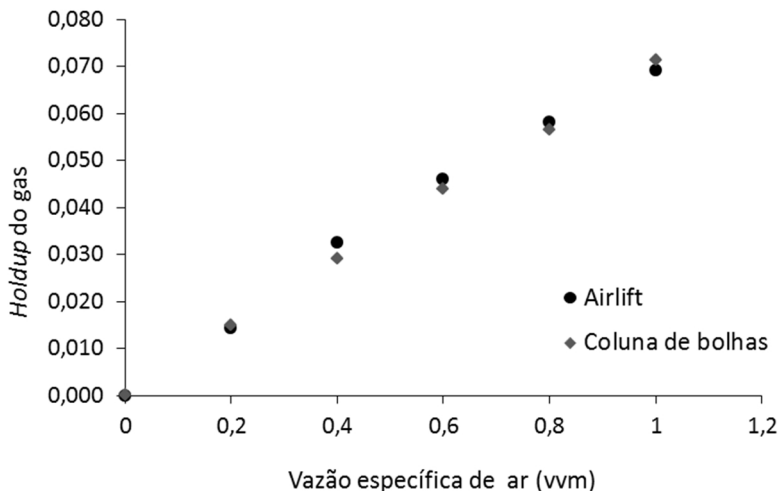


Figura 27. *Holdup* do gás em função da vazão específica de ar na entrada do biorreator.

A Figura 28 mostra a velocidade de circulação de líquido (U_{Lr}) para o biorreator operado como *airlift*, além do *holdup*, em comparação com outro biorreator *airlift* (de circulação externa) de 5 litros (ROSSI, 2006). Esses dados estão apresentados em função da velocidade superficial do gás (vazão de ar que passa através da seção transversal do *riser*). O comportamento hidrodinâmico em biorreatores pneumáticos é complexo e interessante, e um pouco disso pode ser observado nessa figura, onde o biorreator deste trabalho apresentou *holdups* maiores que o biorreator construído por Rossi (2006), mas menores velocidades de circulação de líquido.

A primeira inflexão da curva da U_{Lr} (Figura 28) em cerca de $U_G=0,007$ m/s, indica provavelmente a mudança de regime de bolha de homogêneo (movimento linear de subida) para heterogêneo (turbulento). A segunda inflexão, observada para a maior velocidade do gás, parece indicar uma ineficiência na separação do gás, permitindo sua entrada em contra fluxo (a tendência da bolha é de subida) no *downcomer*.

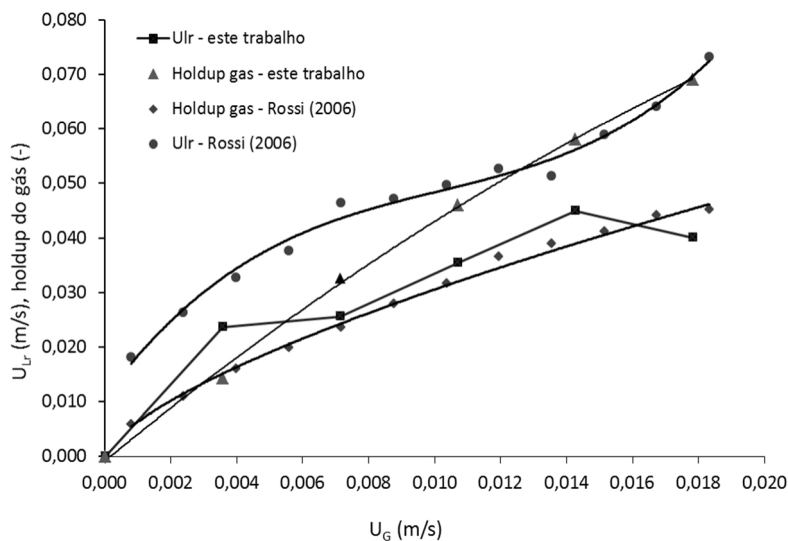


Figura 28. Velocidade de circulação de líquido e *holdup* do gás em função da velocidade superficial do gás (U_G).

5.6.2 Tempo de mistura

Um bom desempenho de um biorreator depende também de um tempo breve de mistura (CHISTI, 1989), fornecendo oxigênio e nutrientes suficientes em todos os pontos do líquido, além de manter o pH homogêneo. Nas Figuras 29 e 30 pode-se determinar o tempo de mistura para o biorreator operando em modo coluna de bolhas e *airlift*, respectivamente, para uma vazão específica de ar baixa (0,4 vvm) e alta (1,0 vvm).

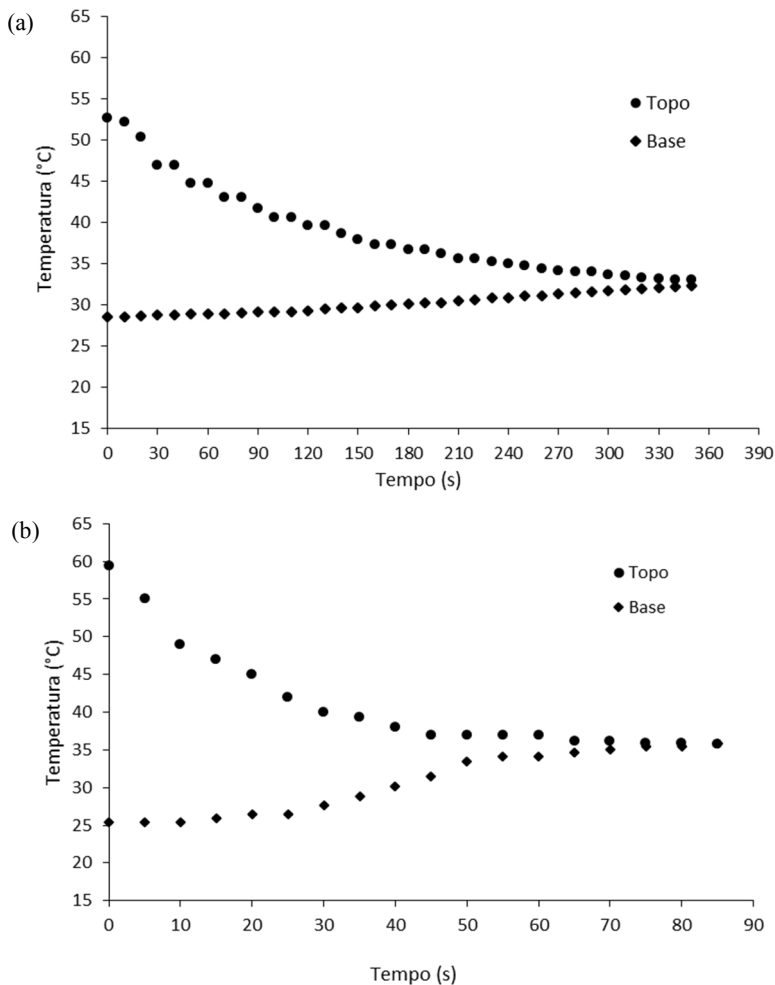


Figura 29. Determinação do tempo de mistura através de pulso de água quente no topo do biorreator operado como coluna de bolhas. Vazão específica de ar de 0,4 vvm (a) e 1,0 vvm (b).

Operando como coluna de bolhas, o tempo de mistura a 0,4 vvm foi cerca de 6 longos minutos, caindo para 80 segundos a 1,0 vvm. Nesse modo de operação seria muito difícil o controle de pH em baixas vazões de ar. Por outro lado, operando como *airlift*, o tempo de mistura foi bem curto, da ordem de 20 segundos a 0,4 vvm. Entretanto, ao invés do tempo

de mistura diminuir em vazões maiores, aumentou para até 30 segundos a 1,0 vvm (Figura 30). Esse aumento é mais um indicativo da ineficiência na separação do gás no topo, fazendo com que parte dele entre no *downcomer*. Com a tendência das bolhas subirem, cria-se uma dificuldade do líquido circular, retardando a mistura.

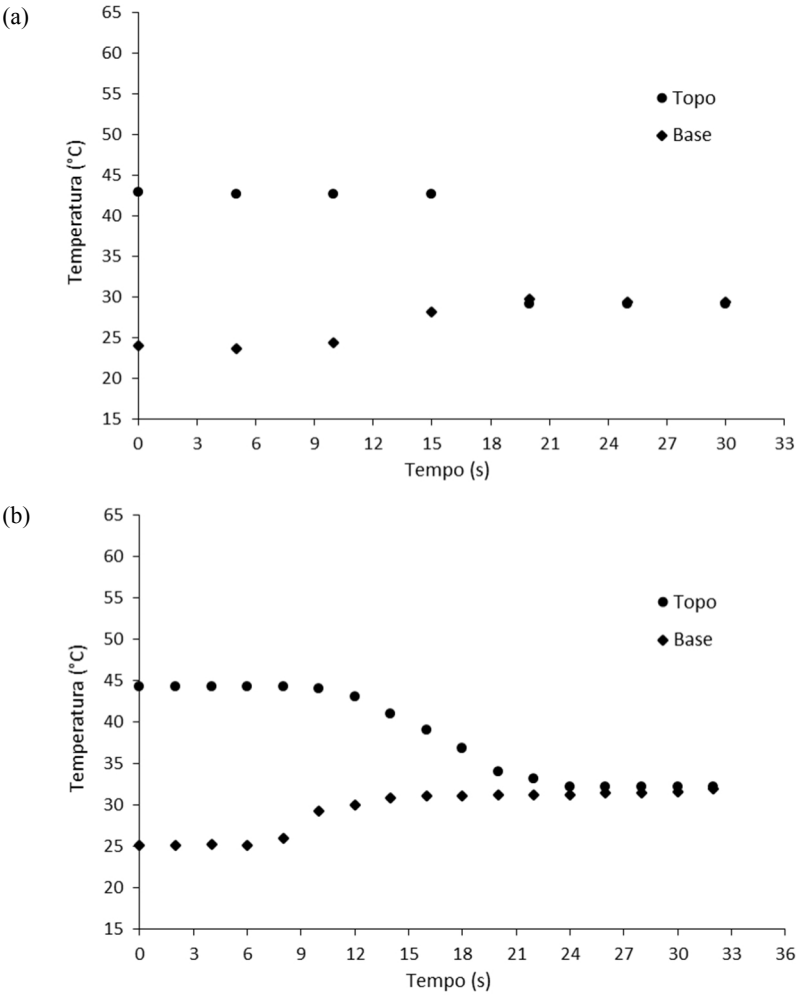


Figura 30. Determinação do tempo de mistura através de pulso de água quente no topo do biorreator operado como *airlift* com circulação interna. Vazão específica de ar de 0,4 vvm (a) e 1,0 vvm (b).

5.6.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

A Figura 31 mostra o biorreator em processo de determinação do k_{La} . Para cada vazão de ar estabelecida se realizou um ensaio dinâmico, utilizando CO_2 para remoção completa do oxigênio dissolvido no líquido.

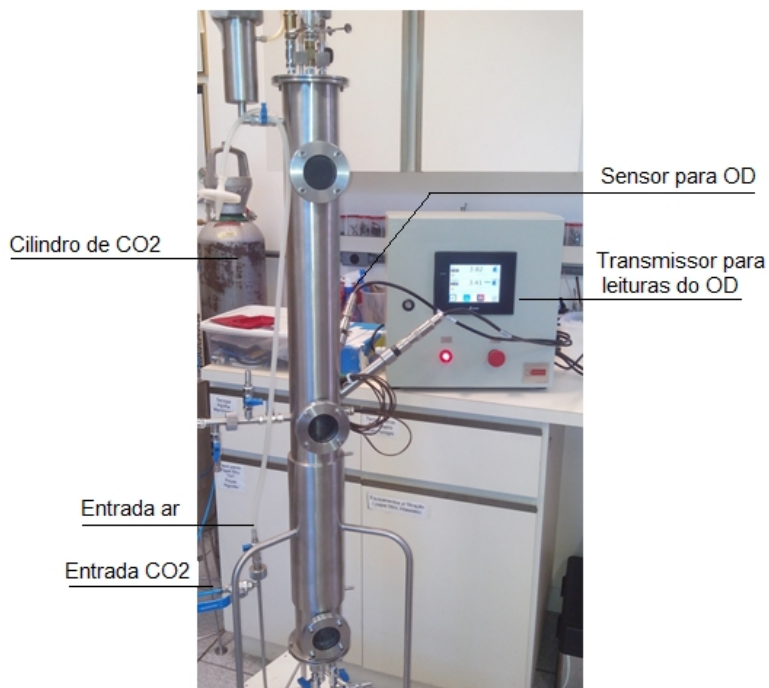


Figura 31. Biorreator em teste: ensaios dinâmicos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). CO_2 sendo injetado para remoção do oxigênio.

A Figura 32 mostra a variação da concentração de oxigênio após a retomada da aeração a 0,6 vvm, onde se verifica que a dinâmica de transferência não foi muito diferente para os dois modos de operação. Curiosamente, os valores de k_{La} não foram também muito diferentes entre os modos de operação para as outras vazões de ar (Figura 33). Se, por um lado, o direcionamento do fluxo (recirculação de líquido) permite melhorar o k_{La} (ver Figura 3 no capítulo da revisão da literatura), por outro lado a consequente redução de espaço para o gás (volume do *downcomer* é de cerca de 15% do volume total do biorreator) atua de

forma contrária, diminuindo esse coeficiente (os valores de z da Equação 5 variaram de 0,821 a 0,912 entre 0,2 a 1,0 vvm, respectivamente).

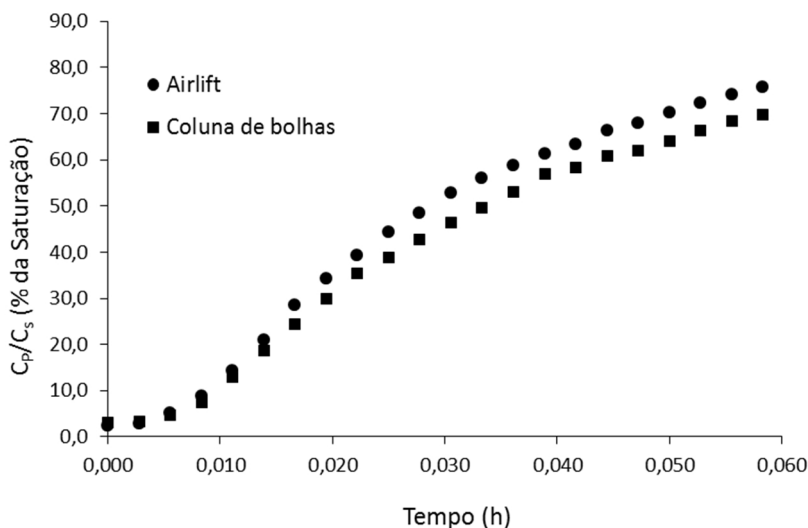


Figura 32. Valores de oxigênio dissolvido em função do tempo, obtidos através de ensaio dinâmico para determinação do k_{La} . Biorreator operado na vazão específica de 0,6 vvm ($3,0 L_{ar}/min$).

Uma prova disso, é que em baixas vazões o k_{La} do coluna de bolhas foi maior que o do *airlift* (o fator z foi de 0,821 para 0,2 vvm e de 0,824 para 0,4 vvm). Com a tendência de maior aumento do k_{La} para biorreatores *airlift*, esperava-se uma diferença de aumento mais expressiva nas vazões mais altas, o que não se observou. Aqui, mais uma vez, se constata que a separação de gás não foi eficiente. Essas evidências também ajudam a explicar a razão para os maiores valores de *holdup* em relação ao de Rossi (2006), pois a retenção de gás no *downcomer* de fato ajuda no aumento do *holdup*, mas não contribui para o aumento do k_{La} . Isso ocorre porque o gás que entra no *downcomer* já é pobre em O_2 e deveria então sair do sistema.

A entrada de gás no *downcomer* não é visível nessa configuração de biorreator. Assim, constatada essa ocorrência através dos dados, o balanço de massa (Equação 4) não está devidamente correto, já que ele considera inexistência de gás no *downcomer*. É interessante notar na Figura 32, por exemplo, uma sutil desaceleração na subida do OD (C/C_s) a partir de 0,033 h, que pode ser devido à exaustão do oxigênio contido

nas bolhas retidas no *downcomer*. Em vazões mais elevadas, mais bolhas são sugadas para dentro do *downcomer*, onde o líquido retorna em sentido descendente, contrário ao movimento natural das bolhas menos densas. A Figura 34 ilustra um aumento possível de 40 % no k_La apenas melhorando a separação do gás. Um separador mais eficiente significa um aumento no custo de construção do equipamento, sendo esse o motivo para não ter sido feito neste trabalho.

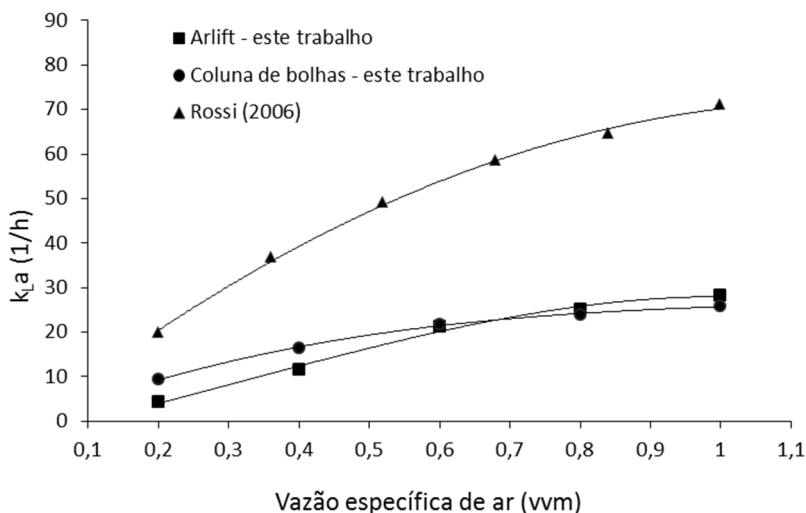


Figura 33. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) em função da vazão específica de ar.

Além disso, outra questão importante relacionada com o k_La é o tamanho das bolhas. Pela dificuldade de se construir um distribuidor de ar com as técnicas simples que estavam disponíveis, não se conseguiu produzir bolhas de tamanho adequado na base do biorreator, com reflexo importante sobre o k_La . Na Figura 33 se observa que os valores obtidos por Rossi (2006) são bastante superiores. Essa diferença, além da diferente geometria do biorreator, deve-se ao distribuidor de ar, em que naquele caso foi utilizada uma pedra porosa que permitiu bolhas menores. Felizmente, um distribuidor mais eficiente pode ser construído a qualquer tempo, melhorando a eficiência de transferência do biorreator.

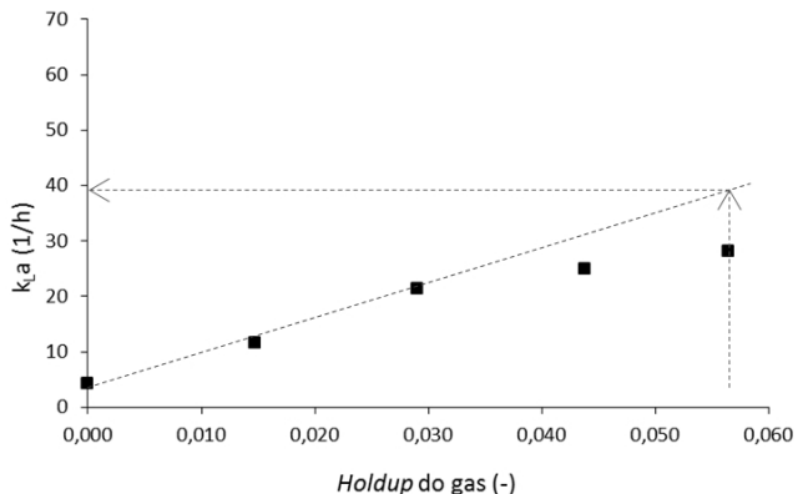


Figura 34. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) em função do *holdup* do gás. As linhas tracejadas mostram a tendência dos valores considerando uma separação adequada do gás no topo do biorreator.

Como o sistema de medição de OD não ficou pronto em tempo de realização dos cultivos, não foi possível verificar se o sistema nessas condições de transferência poderá suprir a demanda de oxigênio pelos fungos sem limitação. Para isso, a concentração de oxigênio crítica precisa ser determinada experimentalmente. De qualquer modo, pelo longo tempo de mistura observado no modo coluna de bolhas, é imperativo operar no modo *airlift* para conseguir o controle efetivo do pH.

A solubilidade do oxigênio é extremamente baixa ($\sim 7,5$ mg/L em água a 25°C) quando comparado com outros nutrientes como glicose e sais (SCHMIDELL, 2001). Um leigo que observa um biorreator pneumático sob aeração, com grande volume de ar sendo injetado, acredita que o sistema esteja operando em plena aerobiose. Os resultados aqui apresentados alertam para a atenção necessária a essa questão, mostrando as dificuldades de se transferir oxigênio para um determinado cultivo, em que apenas uma pequena fração do O_2 do ar é transferido e utilizado pelos micro-organismos.

Para situar um pouco o desempenho do atual biorreator, a Tabela 5 apresenta valores de $k_L a$ e outros parâmetros hidrodinâmicos encontrados na literatura para diversos biorreatores. As situações

possíveis de comparar na Tabela 5 são os últimos três exemplos. Os resultados de Rossi (2006) já foram comentados. Com relação ao biorreator de Gouveia et al. (2003), o presente trabalho se assemelha mais ainda. Uma diferença é que Gouveia et al. (2003) utilizou como *riser* um tubo concêntrico, enquanto neste o tubo concêntrico foi utilizado como *downcomer*. Já as discrepâncias no k_{La} podem ser devido à metodologia utilizada por aquele autor, em que o método do sulfito utilizado é conhecido por superestimar os valores de k_{La} . Além disso, ele não considerou em seu balanço de massa o volume morto do *downcomer*.

Vale observar que os dados de k_{La} não necessitam de correção em função do atraso na resposta do eletrodo, como poderia ser necessário. Isso decorre dos baixos valores de k_{La} encontrados e da rápida resposta do tipo de eletrodo utilizado (SCHMIDELL 2001; ROSSI, 2006).

Tabela 5. Comparação dos parâmetros hidrodinâmicos de diversos trabalhos obtidos para diferentes biorreatores, para uma velocidade de gás (U_g) igual a 0,02 m/s (ROSSI, 2006).

ε (-)	U_{tr} (m.s ⁻¹)	t_{90} (s)	k_{La} (h ⁻¹)	Tipo de biorreator	Composição da fase líquida	V (L)	Referência
0,020	0,20	-	2,5	<i>Air-lift</i> circulação interna	Solução 2% CMC	55	Li <i>et al.</i> (1995)
0,075	0,015	-	33	<i>Air-lift</i> circulação externa	Água torneira	6,5	Pedrimi <i>et al.</i> (1996)
0,015	0,60	-	-	<i>Air-lift</i> circulação externa	Água torneira	725	Abashar <i>et al.</i> (1998)
0,10	0,15	25	-	<i>Air-lift</i> circulação externa	Água e cápsulas de alginato	60	Freitas <i>et al.</i> (2000)
-	-	-	250	Tanque agitado 700 rpm e 0,3 vvm	Meio cultura	9	Badiño Jr. <i>et al.</i> (2001)
0,03	-	-	9	<i>Air-lift</i> circulação interna, híbrido (s/ágit mecânica)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jauregi-Haza (2002)
0,03	-	-	15	<i>Air-lift</i> circulação interna, híbrido (170 rpm)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jauregi-Haza (2002)
0,03	-	-	43	<i>Air-lift</i> circulação interna, híbrido (260 rpm)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jauregi-Haza (2002)
0,025	0,20	-	-	<i>Air-lift</i> circulação externa com leito em Nylon empacotado	Água torneira	12	Meng <i>et al.</i> (2002)
0,02	0,032	30	72	<i>Air-lift</i> circulação interna	Solução sulfito	6	Gouveia <i>et al.</i> (2003)
0,045	0,076	25	71	<i>Air-lift</i> circulação externa	Solução 0,15 M NaCl	5	Rossi <i>et al.</i> (2005a)
0,069	0,038	30	28	<i>Air-lift</i> circulação interna	Solução 0,15 M NaCl	5	Este Trabalho

5.7 Produção de biomassa e EPS em biorreator operado em modo *airlift*

O cultivo no biorreator foi realizado para o *P. ostreatus* var. *florida* e teve duração de nove dias, sendo conduzido até o consumo total da glicose disponível. Os parâmetros definidos para esse cultivo (pH, 4,5, 0,75 g/L de nitrogênio e 2,0 g/L de farelo de trigo) se mostraram apropriados para produção de biomassa e das enzimas de interesse (Figura 35). O meio MNM utilizado neste cultivo foi enriquecido com 1,5 g/L de peptona, de maneira a ajudar no tamponamento do meio e evitar variações muito bruscas de pH. O valor para biomassa atingido ao final do cultivo foi de 4,89 g/L.

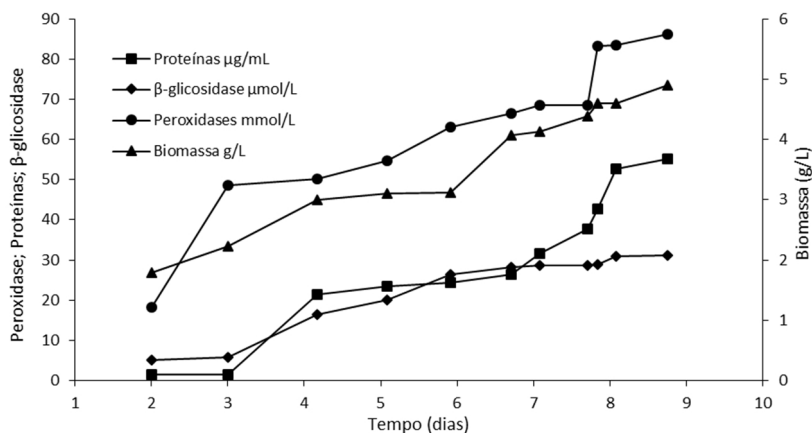


Figura 35. Concentração de enzimas, proteínas e biomassa ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

É possível observar, na Figura 35, que existe uma semelhança entre as curvas de biomassa e de proteínas, o que indica que é possível, para esse cultivo, avaliar o crescimento fúngico através da medição das proteínas solúveis. A curva de peroxidases também se assemelha bastante à curva das proteínas, e pode indicar que a produção de proteínas foi influenciada pela produção de peroxidases durante o cultivo. No caso das enzimas, pode ser observado que houve uma alternância no aumento da concentração de cada uma delas, com o aumento da β-glicosidase ocorrendo logo após o aumento das peroxidases, mostrando uma alternância no estado fisiológico do fungo.

Com exceção de um ponto, devido ao sistema de bombas para controle de pH ainda não estar pronto, não houve grande variação nos

valores de pH, tendo sido mantido um intervalo ótimo para o cultivo do fungo (Figura 36). Também foi verificada a produção de EPS no cultivo, porém, em quantidades bastante baixas. Do início até a metade do cultivo houve um aumento na produção de EPS, acompanhando o crescimento fúngico enquanto que para o restante do cultivo a produção se manteve estável.

O cultivo submerso de *P. ostreatus* é bastante comum, principalmente para a obtenção de polissacarídeos e enzimas, tanto em biorreatores como em frascos agitados mecanicamente. O trabalho realizado por Díaz et al. (2011) cultivou este fungo em pH inicial de 3,5 com duas fontes diferentes de nitrogênio e maior valor de biomassa foi obtido utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Entretanto, um efeito tampão foi obtido no cultivo realizado com extrato de levedura. Um resultado interessante neste trabalho é que a variação de pH foi para mais, atingindo valores acima de 7,0 ao final do cultivo.

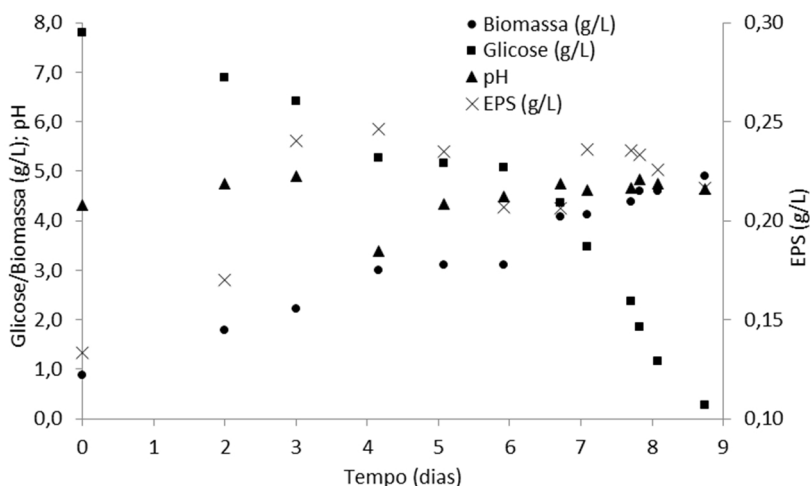


Figura 36. Produção de biomassa e EPS, valores de pH e consumo de glicose ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator airlift.

As peroxidases são enzimas que respondem à existência de fatores estressantes para o fungo, sendo produzidas principalmente durante o metabolismo secundário (MESTER e FIELD, 1998). No caso desse cultivo, mais de um fator pode ser responsável pelo aumento detectado no terceiro dia do cultivo. Além da fragmentação sofrida pelo micélio no

início, a aeração e o meio de cultura líquido são fatores aos quais o fungo precisa se adaptar antes que possa iniciar o crescimento e a produção de biomassa. Outro fator responsável pelo aumento na produção dessas enzimas, como discutido anteriormente, é a adição do farelo de trigo ao meio de cultura, imediatamente após a primeira amostragem no segundo dia de cultivo, indicando que o farelo de trigo induz de maneira intensa a produção dessa enzima. Assim que o fator estressante é reduzido, a produção de peroxidases diminui, como pode ser observado nos dias 3 e 4 de cultivo na Figura 35. Corroborando esses resultados, Chang e Chang (2014) obtiveram melhor indução na atividade de enzimas do sistema lignolítico em *P. eryngii* utilizando farelo de trigo e confirmam a escolha desse aditivo como um bom indutor para as enzimas analisadas.

O aumento da β -glicosidase no quarto dia de cultivo, acontece logo após o pico para as peroxidases e acompanha a curva de aumento da biomassa. A velocidade com a qual o fungo é capaz de utilizar a glicose, é o que define a velocidade com a qual a β -glicosidase liberará esse monossacarídeo para sua utilização. Quando ocorre um acúmulo de celobiose, a velocidade de degradação da celulose diminui. Isto ocorre porque esse dissacarídeo é capaz de se ligar ao sítio ativo da celobiohidrolase, inibindo por competição a atividade dessa enzima. Conforme a glicose disponível é utilizada, a celobiose se desliga da celobiohidrolase e é degradada pela β -glicosidase, liberando mais glicose para o fungo. É interessante observar que a presença de celobiose no meio também pode agir como sinalização para a indução das enzimas celulolíticas na presença de celulose. Neste caso, o feedback positivo se dá pela pouca ou nenhuma disponibilidade de açúcares mais simples (DEACON, 2006).

Próximo aos últimos dias, o cultivo já estava em um estado considerado crítico, com grande quantidade de biomassa e parte dela presa às partes fixas do biorreator e com meio de cultura bastante viscoso, o que dificultava a mistura e a transferência de massa. A vazão de ar precisou ser aumentada, porém, a alta viscosidade do meio de cultura dificultava o espalhamento das bolhas no biorreator e consistia em um obstáculo para a troca gasosa. Além disso, a quantidade de biomassa presente aumentou a pressão exercida sobre as bolhas. O aumento na pressão acabou por aumentar a coalescência das bolhas no trajeto de subida, dificultando ainda mais a difusão do oxigênio para o líquido. Essas condições são bastante estressantes para o fungo, como indica o aumento na produção de peroxidases no oitavo dia de cultivo. Essa viscosidade é consequência da produção e secreção de EPS. Inicialmente, esses valores acompanharam o aumento da biomassa, sofrendo uma

queda na metade do cultivo e mantendo-se estável até o final dele (Figura 36). Mesmo nessas condições, o fungo foi capaz de continuar a produção de biomassa até o esgotamento total da glicose, obtendo aproveitamento máximo do substrato disponível.

Padrão semelhante para a produção de EPS foi obtido por WISBECK, FURLAN e NINOW (2005) onde após o pico de produção ocorreu uma diminuição nos valores de EPS, que voltaram a ter valores próximos aos níveis iniciais. A explicação para esse fenômeno está provavelmente associada à produção de β -glucanases. As médias dos valores encontrados (em g/L) variaram entre 0,210 e 1,325, com influência positiva do valor inicial de glicose utilizada. A produção de EPS por *P. sajor-caju* em cultivo realizado em STR por Confortin et al. (2008) foi de 1,18 g/L em cultivo com glicose e 1,58 g/L em cultivo com sacarose, este último semelhante ao valor obtido por Rosado et al. (2003) com *P. ostreatus* de 1,4 g/L, porém utilizando valor inicial de glicose de 60 g/L. As diferenças na obtenção de EPS se devem não somente às técnicas de extração utilizadas, mas também às fontes de carbono e condições de cultivo fornecidas ao fungo, além do tipo de biorreator utilizado, embora condições de agitação e aeração pareçam ser mandatórias para uma produção mais eficiente. As melhores condições para a obtenção de maiores valores de EPS não necessariamente refletem aquelas benéficas à produção de biomassa, sendo necessária a otimização das condições de cultivo para ambos os parâmetros (SEVIOUR et al., 2011; MAHAPATRA e BANERJEE, 2013). A caracterização do EPS produzido ao longo do cultivo ainda será realizada e será de extrema importância para o trabalho. Esse resultado permitirá que a extração seja otimizada, aumentando o rendimento obtido.

A Figura 37 mostra que aparentemente houve uma mudança no coeficiente de conversão de substrato (glicose) em biomassa durante o cultivo, a partir do sétimo dia (Figura 36). Até o sétimo dia a conversão obtida foi de 0,86, caindo para 0,21 durante o restante do cultivo. Esse quadro é de difícil interpretação, pois além da glicose adicionada ao meio, há a glicose liberada a partir do farelo de trigo. Por outro lado, a biomassa aderida ao biorreator aumenta ao longo do cultivo, diminuindo a quantidade na amostra (Figura 38), mas também parte do farelo de trigo fica aderida à biomassa amostrada. Além disso, como o sistema de leitura de OD não estava disponível quando do cultivo, uma provável concentração abaixo do nível crítico também pode ter afetado o conjunto de reações metabólicas, de maneira que menor quantidade de biomassa foi produzida a partir do sétimo dia. De qualquer modo, isso é mais um dado que reforça o *know-how* do LBP, que preconiza que cultivos

fúngicos em biorreator devem ser dimensionados para serem realizados dentro do prazo de uma semana.

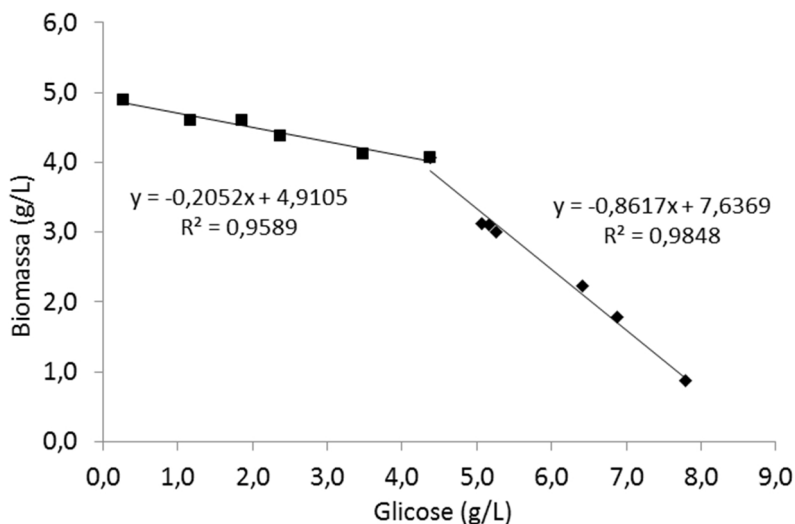


Figura 37. Determinação da conversão de glicose em biomassa para o cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

Ao final do cultivo, o visor superior do biorreator já estava completamente tomado pela biomassa (Figura 38 A) e quando da desmontagem do biorreator foi encontrada biomassa fixa à base do *riser* (Figura 38 B), no topo dele e em torno dos visores. A velocidade específica de crescimento do fungo foi de 0,15 1/d (Figura 39), o que permitiu o fungo duplicar a biomassa em torno de 4 dias. Esse valor baixo para a velocidade específica de crescimento pode ser consequência da condição do meio e da necessidade da produção de grande quantidade das enzimas degradadoras pelo fungo para utilização do substrato. Com base na velocidade específica de produção de proteínas solúveis (0,38 1/d, Figura 40), sua concentração duplicou a cada 1,8 dias. Márquez-Rocha et al. (1999) obtiveram um rendimento ($Y_{X/S}$) de 0,51 em um cultivo de *P. ostreatus* com velocidade específica de crescimento de até 0,86 1/d em condições ótimas de aeração e agitação em um STR, indicando que existe o potencial para que esse fungo cresça mais rapidamente com o melhoramento das condições de cultivo.

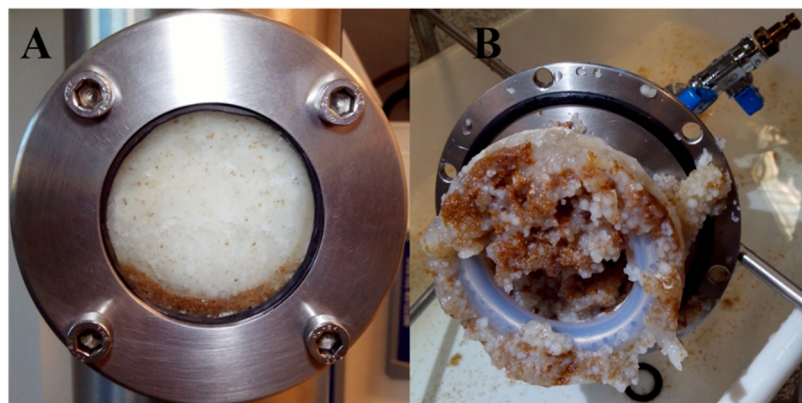


Figura 38. Acúmulo de biomassa no visor superior do biorreator *airlift* ao 7º dia de cultivo (A), e na base do *riser* quando da desmontagem do biorreator (B).

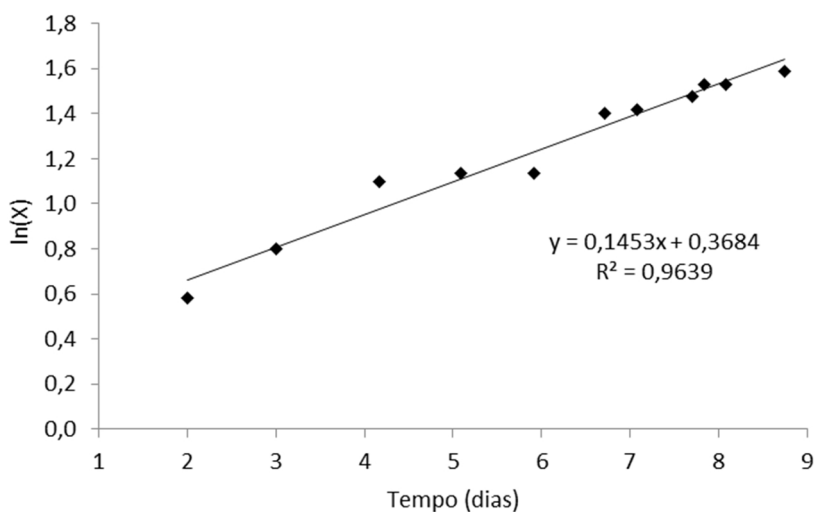


Figura 39. Determinação da velocidade específica de crescimento média para o cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

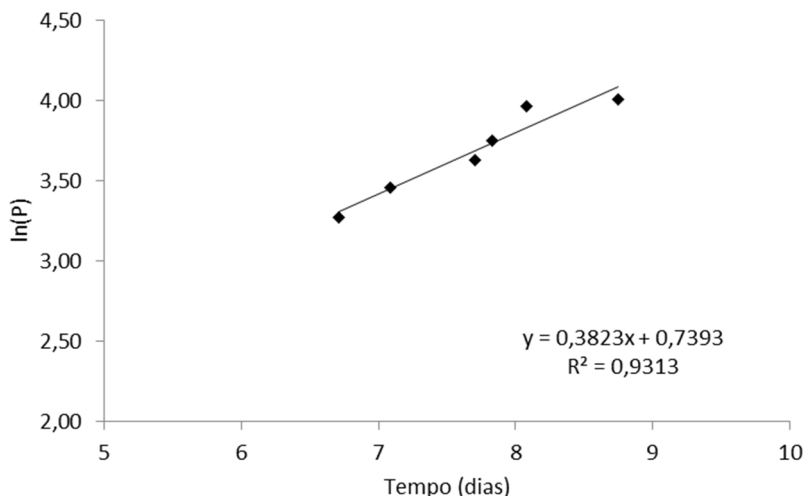


Figura 40. Determinação da velocidade específica de produção de proteínas para o cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

Os valores de enzimas encontrados no cultivo corroboram os experimentos anteriores (itens 5.2 e 5.3), onde valores maiores para peroxidases foram encontrados (Figura 41). É interessante observar que entre o 5º e 8º dias de cultivo houve uma estabilização na produção de ambas as enzimas, mas a produção de biomassa teve um aumento, com dois picos, indicando uma condição mais estável para que o fungo pudesse crescer mais rapidamente. Logo em seguida há um pico na produção de peroxidases, seguida de um pico de β -glicosidase, seguido novamente por um aumento da biomassa até a finalização do cultivo. Isso mostra que existe uma fina regulação pelo fungo para degradação do substrato e seu posterior consumo, otimizando o esforço metabólico para que não haja desperdício energético.

A Figura 42 mostra as curvas de produção de proteínas e biomassa pelo fungo durante o cultivo. Até pouco mais da metade do cultivo, existe uma relação bastante clara entre os valores das duas variáveis, que possuem curvas bastante semelhantes. Do sétimo dia em diante há uma estabilização na produção de biomassa, mas a produção de proteínas continua aumentando, provavelmente devido ao aumento na concentração de peroxidases. Como discutido anteriormente, a biomassa que ficou retida no biorreator provocou um erro para menos nas amostragens, resultando neste padrão de curva.

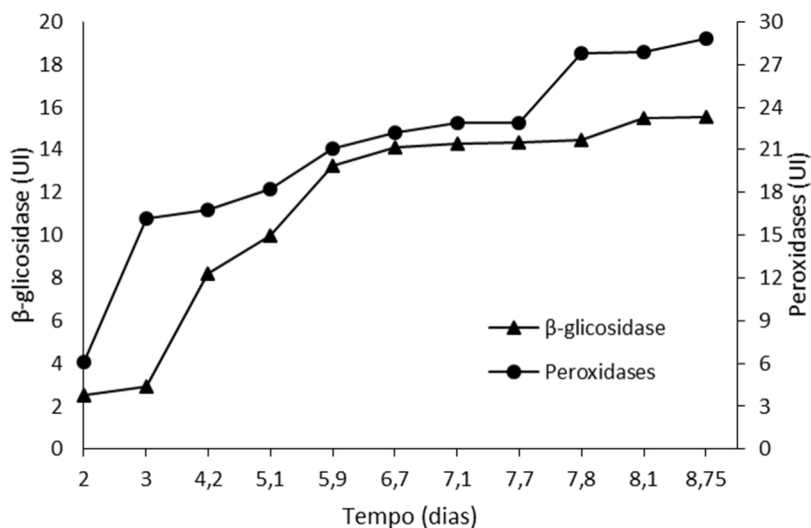


Figura 41. Unidades de β-glicosidase e peroxidases produzidas ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator airlift.

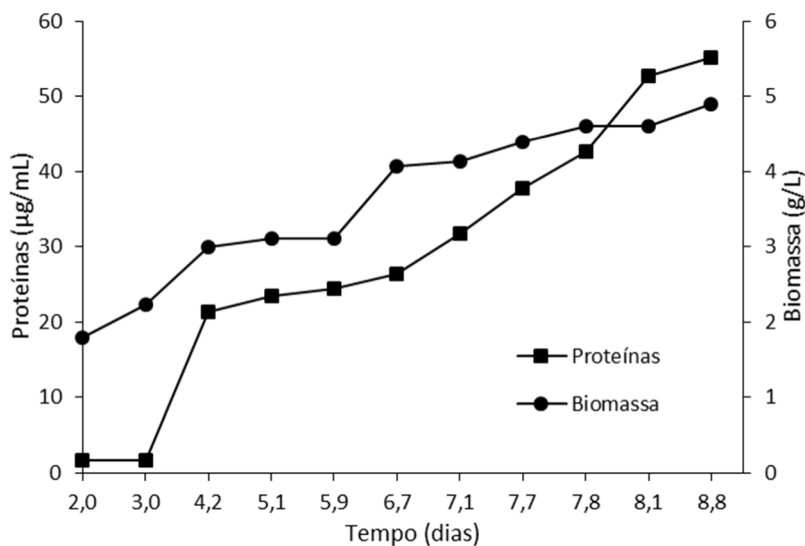


Figura 42. Quantidade de proteínas e biomassa produzidas ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator airlift.

Quando é feita a relação entre a concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$), peroxidases (mmol/L) e β -glicosidase ($\mu\text{mol/L}$) e a biomassa (g/L), fica claro que as peroxidases foram as enzimas mais produzidas por unidade de biomassa, com valores altíssimos logo no início do cultivo (Figura 43). Os valores para a relação peroxidases/biomassa e proteínas/biomassa apresentam uma curva mais semelhante ao final do cultivo, enquanto a relação β -glicosidase/biomassa mantém valores semelhantes após o pico ocasionado pela indução inicial.

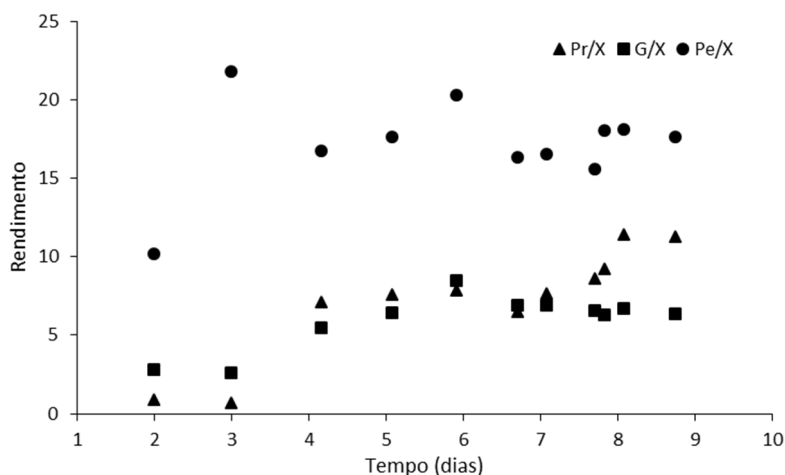


Figura 43. Valores para o rendimento de proteínas (Pr), β -glicosidase (G) e peroxidases (Pe) em relação à biomassa (X) produzida ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

Apesar das dificuldades das análises, principalmente pela presença do farelo de trigo no meio de cultura, e do biorreator não estar devidamente concluído e caracterizado quanto à sua hidrodinâmica, o cultivo do fungo se mostrou bastante interessante. A biomassa foi produzida em quantidade máxima possível, pois o biorreator ficou em visivelmente em condições críticas. A biomassa, considerando a quantidade presa no biorreator, deve ter atingido uma concentração em torno de 7 g/L. As análises enzimáticas e os dados de conversão apontam para a utilização do farelo de trigo, recompensando a estratégia utilizada para melhorar a qualidade do inoculante em alginato. Embora os valores para EPS tenham sido baixos, fica evidente a capacidade que o fungo tem de produzi-los em quantidade que altere de maneira intensa as condições de cultivo. O conhecimento sobre sua estrutura química permitirá maior

entendimento sobre a produção desse material e como sua produção poderá ser otimizada. Os EPS exercem uma função essencial para o metabolismo fúngico, sendo importantes para a manutenção da umidade em torno do micélio, atuando como regulador da concentração extracelular de glicose e manutenção das condições ótimas para a atividade enzimática. Para a indústria farmacêutica, EPS são essenciais no desenvolvimento de novos medicamentos e suplementos, com demanda para obtenção de alto rendimento e pureza da molécula, tornando o processo de produção de EPS um negócio extremamente rentável.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam não apenas a possibilidade da produção de um inoculante em alginato de qualidade produzido com tecnologia, de maneira rápida e eficiente, mas também a possibilidade da obtenção e utilização de derivados do cultivo fúngico para aumentar o rendimento e rentabilidade do bioprocessos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no trabalho demonstram que é possível produzir um inoculante em alginato de maneira biotecnológica, com qualidade semelhante àquela do inoculante tradicional. A utilização de aditivos se mostrou benéfica não somente à indução das enzimas degradadoras de material lignocelulósico, mas também à manutenção da viabilidade do inoculante ao longo do tempo de armazenamento. A viabilidade observada chega a ser pelo menos três vezes maior do que aquela para o inoculante tradicional. A princípio, o uso da serragem se mostra mais benéfica do que a farinha de trigo integral, principalmente para o *L. edodes*, no que toca a viabilidade do inoculante e colonização do substrato de produção de cogumelos. Mas é importante que outros aditivos também sejam avaliados quanto a essa capacidade.

A colonização dos substratos pelos inoculantes em alginato ocorreu dentro do recomendado pelos guias de produção de cogumelos, apontando para o potencial de seu uso em substituição ao inoculante em grãos. Entretanto, é necessário que essa avaliação seja feita também a campo, comparando a eficiência biológica de produção de cogumelos entre o inoculante em grãos e o inoculante em alginato.

O cultivo submerso sob aeração, é adequado para a produção de biomassa fúngica para fins de veiculação em hidrogel de alginato de cálcio e a utilização de um biorreator *airlift* se mostrou eficiente para a produção de grande quantidade de biomassa, além da produção de EPS pelo *P. ostreatus* var. *florida*, apontando para a possibilidade de aumento na rentabilidade do bioprocessos.

Tanto a serragem quanto o farelo de trigo se mostraram bons indutores para as enzimas analisadas, havendo o potencial de melhorar a indução da β -glicosidase. Ambos os aditivos induziram de maneira bastante intensa as peroxidases, corroborando os resultados da literatura. Essa indução também pôde ser observada no cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*, confirmando que a utilização de aditivo durante o bioprocessos prepara o metabolismo fúngico para a colonização do substrato.

O bioprocessos desenvolvido é apenas um modelo inicial e que precisa ser otimizado. Parte da caracterização do biorreator aqui utilizado foi feita após a realização do cultivo, mas a sua eficiência pode ser aumentada, com consequente aumento da eficiência do bioprocessos em si. A escolha de utilizar o biorreator no modo *airlift* se mostrou adequada, uma vez que o tempo de mistura no modo coluna de bolhas é maior, o que poderia prejudicar sobremaneira a viabilidade fúngica.

A robustez do *P. ostreatus* var. *florida* permite que ele seja um bom organismo modelo quando do desenvolvimento de bioprocessos, pois ele é capaz de crescer rapidamente e os resultados obtidos podem então ser otimizados para outros fungos.

Esse trabalho mostra, enfim, que a continuidade de pesquisas nessa área é bastante promissora, contribuindo para um melhor entendimento da biologia do fungo e para o desenvolvimento de bioprocessos rentáveis, com aplicação comercial. Além disso, a possibilidade de produzir um inoculante fúngico, para produção de cogumelos comestíveis com tecnologia e de maneira eficiente, pode permitir o barateamento da produção, aumento da rentabilidade do negócio e diminuição do preço final para o consumidor de maneira a atender à demanda do mercado.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, N. et al. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué! by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. **Scientia Horticulturae**, v.161, pp.65-69, 2013.

ALEXANDRE, J. et al. Phase I and pharmacokinetic study of irofulven administered weekly or biweekly in advanced solid tumor patients. **Clinical Cancer Research**, v.10, n.10, p.3377-3385, 2004.

ALICEWEB. **Sistema de Análise de das Informações de Comércio Exterior via Web**. Disponível em: <aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em 30 nov. 2014.

ANDERSEN, T. et al. In situ gelation for cell immobilization and culture in alginate foam scaffolds. **Tissue Engineering: Part A**, v.20, n.3-4, pp.1-11, 2013.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. Disponível em: <<http://www.anpc.org.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2014.

AVELAR D.C.S. et al. Crescimento em campo de mudas clonais de eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos. In: **XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2013, Florianópolis. Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2013.

BAK, W.C. et al. Determination of glucans contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. **Microbiology**, v.42, n.3, pp.301-304, 2014.

BARRETO, S.M.; LÓPEZ, M.V.; LEVIN, L. Effect of culture parameters on the production of the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1361-1366, 2008.

BARTON, L.L.; NORTHUP, D.E. **Microbial Ecology**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011. 440p.

BELLO, R.A.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Liquid circulation and mixing characteristics of airlift contactors. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.62, pp.573-577, 1984.

BETTIN, F. et al. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, pp.1-9, 2009.

BLENKE, H. Loop reactors. **Advances in Biochemical Engineering**, v.13, pp.121-214, 1979.

BORCHERS, A.T. et al. Mushrooms, tumors and immunity. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.221 pp.281-293, 1999.

BORCHERS, A.T. et al. Mushrooms, tumors and immunity: An Update. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, n.5, pp.393-406, 2004.

BORCHERS, A.T. et al. The immunobiology of mushrooms. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n.3, pp.259-278, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, pp.248-254, 1976.

BRUM, A.A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos**. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In: ROYSE D.J. **Mushroom biology and mushroom products**. Pennsylvania: Penn State University, 1996. pp. 113-122.

CAMELINI, C.M. **Produção de Biomassa do Fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólidos e submersos para obtenção de polissacarídeos bioativos**. 2010. 150p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARDOZO, F.T.G.S. et al. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, v.92, pp.108-114, 2011.

CARDOZO, F.T.G.S. et al. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, pp.265-272, 2013a.

CARDOZO, F.T.G.S. et al. *In vivo* anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.6, pp.2541-2549, 2013b.

CHANG, B.V.; CHANG, Y.M. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation, **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.012>, 2014.

CHANG, R. Functional properties of edible mushroom. **Nutrition Reviews**, v.54, n.11, pp.91-93, 1996.

CHANG, S.T. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: PETER, C.K. **Mushrooms as Functional Foods**, Hoboken:Cheung John Wiley & Sons, Inc., pp.1-33, 2008.

CHANG, S.T., BUSWELL, J.A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.473-476, 1996.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact**, 2^a ed, Boca Raton: CRC Press, 2004.

CHANG, S.T.; WASSER, S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.14, n.2, pp.95-134, 2012.

CHICATTO, J.A. et al. Evaluation of hollocelulase production by *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler during the submerged fermentation

growth using RSM. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.1, pp.243-250, 2014.

CHISTI, M.Y. **Airlift Bioreactors**. London: Elsevier Applied Sciences, 345p., 1989.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U.J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.10, pp.143-153, 2002.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Prediction of liquid circulation in airlift reactors with biological media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.42, pp.211-219, 1988.

CONFORTIN, F.G. et al. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, pp.1149-1155, 2008.

DANG, J.M.; LEONG, K.W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, pp.487-499, 2006.

DAS, S.K. et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. **Fitoterapia**, v.81, pp.961-968, 2010.

DEACON, J.W. **Fungal Biology**. 4th Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006. 371p.

DERIKVAND, P.; ETEMADIFAR, Z. Improvement of biodesulfurization ratio of alginate immobilized *Rhodococcus erythropolis* R1. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.7, n.3, e9123, 2014.

DÍAZ, R. et al. Effect of medium pH on laccase zymogram patterns produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.18, pp.2720-2723, 2011.

DUARTE FILHO, P.F.M. **Estudos sobre o crescimento e a viabilidade de fungos ectomicorrízicos em cultivo submerso**. Florianópolis, 2009. 114p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

EGUCHI, F. et al. Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Traditional Medicine**, v.16, p. 201-207, 1999.

EIRA, A.F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). Anais da **III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, Mogi das Cruzes, SP. 83-95 p. 2000.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. Módulo de cogumelos – FEPAF 2ª ed Botucatu: Unesp, 1997. 115 p.

ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.14, n.3, pp.211–239, 2012.

ELISASHVILI, V. et al. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v.99, pp.457-462, 2008.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E. et al. Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. **Fungal Genetics and Biology**, v.72, pp.150-161, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Proceedings of the workshop: Forests for poverty reduction – Changing Role for Research, Development and Training Institutions**, Bangkok, 2005. 219p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Diversification booklet 7 – Make money by growing mushrooms**, Rome, 2009. 54p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook – World Food and Agriculture**, Rome, 2013. 289p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

FU, C.C.; WU, W.T.; LU, S.Y.. Performance of airlift bioreactors with net draft tube. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.332-342, 2003.

GERN, R.M.M. et al. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v.99, pp.76-82, 2008.

GHORAI, S., et al. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v.42, p.577-587, 2009.

GIBBS, B.F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, pp.213-224, 1999.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.31, pp.267-285, 1998.

GOUVEIA, E.R.; HOKKA, C.O.; BADINO Jr., A.C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, pp.363-374, 2003.

GUTIÉRREZ, A. et al. Hyphal-sheath polysaccharide in fungal deterioration. **Science of the Total Environment**, v. 167, pp.315-328, 1995.

IMTIAJ, A.; RAHMAN, S.A. Economic viability of mushroom cultivation to poverty reduction in Bangladesh. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.8, pp.93-99, 2008.

JOSE, N.; AJITH, T.A.; JANANRDHANAN, K.K. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Agaricomycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.4, pp.329-335, 2002.

KACHLISHVILI, E. et al., Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, pp.391-397, 2006.

KAVANAGH, K. Fungal fermentation systems and products. In: KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. West Sussex: Wiley, 2005. pp.89-111.

KAWAGOE, M. et al. Submerged culture of *Agaricus blazei* mycelium in a bubble column fermentor. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.37, n.8, pp.1056-1061, 2004.

KAWASE, W.; MOO-YOUNG, M. Liquid phase mixing in bubble columns with Newtonian and non-Newtonian fluids. **Chemical Engineering Science**, v.41, pp.1969-1977, 1986.

KNOP, D.; YARDEN, O.; HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, pp.1025-1038, 2015.

KOSSEN, N.W.F.; METZ, B. The influence of shear upon the morphology of moulds. In: **Abstracts Fifth International Fermentation Symposium**, Berlin, 1976.

KUEK, C.; TOMMERUP, I.C.; MALAJCZUCK, N. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalyptus for plantations. **Mycological Research**, v.96, pp.273-277, 1992.

KWON, H.; CHOI, K.W. Support for poverty alleviation through mushroom farming: the MushWorld Foundation's case. In **Proceedings of the 5th International Conference**, Shanghai, China, 2005. v.12 supplement, pp.494-502.

LE TACON, F. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. **Annales des Sciences Forestières**, v.40, pp.165-176, 1983.

LE TACON, F. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. **Canadian Journal of Botany**, v.63, pp.1664-1668, 1985.

LEATHAM, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinula edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.4, pp. 859-867, 1985.

LEE, B.C. et al. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, pp.369-376, 2004.

LIN, E.S.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, pp.182-187, 2006.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JÜLICH, W.D. The pharmacological potential of mushrooms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2, n.3, pp.285-299, 2005.

LOTFIPOUR, F.; MIRZAEI, S.; MAGHSOODI, M. Evaluation of the effect of CaCl_2 and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.2, n.1, pp.71-78, 2012.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12^a edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MAHAPATRA, S. BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: Production, composition and applications. **Microbiology Insights**, v.6, pp.1-16, 2013.

MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: an inter species comparative study. **Food Chemistry**; v.65, pp.477-482, 1999.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J. et al. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnology Techniques**, v.13, pp.29-32, 1999.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, n.2, pp.153-163, 1969.

MATA, G.; SAVOIE, J.M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, pp.513-519, 1998.

MATA, G. et al. Reduction of the incidence of *Trichoderma* spp. using substrate supplementation with peat and an alternative spawn during cultivation of *Lentinula edodes* on pasteurized wheat straw. **Agronomie: Agriculture and Environment**, v.18, pp.515-520, 1998.

MATTILA, P. et al. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, pp.2343-2348, 2001.

MAUPÉRIN, C.H. et al. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. **Canadian Journal of Botany**, v.65, pp.2326-2329, 1987.

MENG, A.X.; HILL, G.A.; DALAI, A.K. Hydrodynamic characteristics in an external loop airlift bioreactor containing a spinning sparger and a packed bed. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.41, pp.2124-2128, 2002.

MERCHUK, J.C. Why use air-lift bioreactors? **Tibtech**, v.8, pp.66-71, 1990.

MESTER, T.; FIELD, J.A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isoenzyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.25, pp.15412-15417, 1998.

MIKIASHVILI N. et al. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, pp.999-1002, 2006

MODA, E.M. **Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana de açúcar lavado e uso de aditivos visando sua conservação “in natura”**. 2003. 100 p. Dissertação Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba.

MODA, E.M.; HORII, J.; SPOTO, M.H.F. Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Scientia Agricola**, v.62, pp.127-132, 2005.

MONDAL, S.R. Comparative study on growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on different substrates. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v.8, n.2, pp.213-220, 2010.

MUDGETT, R.E. Solid-state fermentation. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. 486p.

MUÑOZ, C. et al. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**, v.34, pp.1-5, 1997.

MURPHY, R.A.; HORGAN, K.A. Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi. In: KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. West Sussex: Wiley, 2005. pp.113-143.

MUSHWORLD. Free From Poverty - **Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation**, 2004. 263p.

MUSHWORLD. Free From Poverty - **Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation**, 2005. 279p.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K.A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, pp.146-149, 2003.

OHNO, N. et al., Antitumor–glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.7, pp.820-828, 2001.

OLIVEIRA, L.P. **Produção de inoculante, seleção e aplicação de fungos ectomicorrízicos em mudas de *Pinus taeda* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 77p., 2004.

ONISHI, H. et al. Preparation of chitosan/alginate/calcium complex microparticles loaded with lactoferrin and their efficacy on carrageenan-induced edema in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.36, n.8, pp.879-884, 2010.

PATERSON R.R.; LIMA, N. Biomedical effects of mushrooms with emphasis on pure compounds. **Biomedical Journal**, v.37, n.6, pp.357-368, 2014.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ZERVAKIS, G. Monitoring of mycelium growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural residues. In: SANCHEZ, J.E.; HUERTA, G.; MONTIEL, E. **Mushroom biology and mushroom products**. Cuernavaca: UAEM, pp.279–287, 2002.

PHILIPPOUSSIS, A. et al. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass and wheat straw residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, pp.285-297, 2011.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR S. Biological and pharmacological activity on higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie Mycologie**, v.27, n.6, pp.311-333, 2006.

PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, pp.253-274, 1991.

ROSADO, F.R.; KEMMELMEIER, C; COSTA, S.M.G. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible Brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* SING. **Journal of Basic Microbiology**, v.42, pp.37-44, 2002.

ROSADO, F.R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “Florida” (Jack.: Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v.43, pp.230–237, 2003.

ROSSI, M.J. **Produção de inoculantes de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator *airlift***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 93p., 2001.

ROSSI, M.J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. 183p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROSSI, M.J.; FURIGO JR., A.; OLIVEIRA, V.L. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations (A Review). **Food Technology and Biotechnology**, v.45, n.3, pp.277-286, 2007.

ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, pp.175-181, 2002.

ROSSI, M.J. et al. Inoculante de *Agaricus brasiliensis* produzido em biorreator *airlift* e encapsulado em gel de alginato de cálcio. In: **Anais da FERTBIO2004** (CD-ROM), Lages-SC, 2004.

ROYSE, D.J. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake. **Mycologia**, v.77, n.5, pp.756-762, 1985.

ROYSE, D.J. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.527-531, 2002.

SAEKI, N. et al. Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme

detection by enzymatic staining on native-PAGE. **Mycoscience**, v.52, pp.132-136, 2011.

SAKHANOKHO, H.F; POUNDERS, C.T.; BLYTHE, E.K. Alginate encapsulation of *Begonia* microshoots for short-term storage and distribution. **The Scientific World Journal**, v.2013, Article ID 341568, 7p. 2013.

SANTOS, D.C.F. et al. Sobrevivência e crescimento de mudas clonais de eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos em viveiro comercial. In: **Fertbio2012**, 2012, Maceió - AL. Anais do Fertbio2012, 2012.

SAVOIE, J.M. et al. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. In: VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. **Science and Cultivation of Edible Fungi**. Rotterdam, the Netherlands: A.A Balkema, pp.667-674, 2000.

SEVIOUR, R.J. et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.31, n.2, pp.170-185, 2011.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biотecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p.277-331, 2001.

SHARMA, S. et al. Growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. **Journal on New Biological Reports**, v.2, n.1, pp.3-8, 2013.

SHIH, I.L. et al. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. **Bioresource Technology**, v.99, pp.785-793, 2008.

SIEGEL, M.H.; MERCHUK, J.C.; SCHÜGERL, K. Airlift reactor analysis: interrelationships between riser, downcomer, and gas-liquid separator behaviour, including gas recirculation effects. **AIChE Journal**, v.32, pp.1585-1596, 1986.

SILVA, C. da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v.29, n.1, pp.85-92, 2006.

SINGH, M.P.; VISHWAKARMA, S.K.; SRIVASTAVA, A.K. Bioremediation of direct blue 14 and extracellular ligninolytic enzyme production by white rot fungi: *Pleurotus* spp. **BioMed Research International**, v.2013, Article ID 180156, 4p. 2013.

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, pp.177-181, 1995.

STAJIC, M. et al. Screening of laccase, manganese peroxidase and versatile peroxidase activities of the genus *Pleurotus* in media with some raw plant material as carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.177, pp.155-164, 2004.

STAMETS, P. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. 3^a Ed., California: Ten Speed Press, 2000. 592p.

STAMETS, P.; CHILTON, J.S. **The Mushroom Cultivator – A Practical Guide to Growing Mushrooms at home**. Seattle: Homestead Book Co, 1984. 415p.

SZKLARZ, G.D. et al. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v.81, n.2, pp.234-240, 1989.

TAGUCHI, H. et al. The effects of agitation on disruption of the mycelial pellets in stirred fermentors. **Journal of Fermentation Technology**, v.46, pp.814-822, 1968.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, pp.689-692, 1987.

US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27**. Versão atualizada: Agosto 2014. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Acesso: 23 nov. 2014.

VAMANU, E. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms.

Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.2012, Article ID 565974, 8p. 2012

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. In: KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. West Sussex: Wiley, 2005. pp.2-34.

WALTER, J.F., PAAU, A.S. Microbial inoculants production and formulation. In: METTING Jr., F.B. **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Marcel Dekker, p.579-594, 1993.

WASE, J. et al. Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, pp.1166-1172, 1985.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. **Introduction to fungi**. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 875p.

WISBECK, E.; FURLAN, S.A.; NINOW J. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. *Revista Saúde e Ambiente*, v.6, n.2, pp.19-22, 2005.

ZAMIL, M.F.; CADILHON, J.J. Developing small production and marketing enterprises: mushroom contract farming in Bangladesh. **Development in Practice**, v.19, n.7, pp.923-932, 2009.

APÊNDICE A – Tabela dos valores obtidos para proteínas, biomassa, glicose, pH e EPS ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

Amostra	Tempo (dias)	Proteínas (µg/mL)	Biomassa (g/L)	Glicose (g/L)	pH	EPS (g/L)
0	0,0	--	0,24	7,8	4,32	0,13333
1	2,0	1,58	1,78	6,88	4,76	0,17025
2	3,0	1,58	2,23	6,41	4,91	0,24025
3	4,2	21,40	3,00	5,26	3,38	0,24643
4	5,1	23,51	3,11	5,16	4,33	0,23514
5	5,9	24,45	3,11	5,07	4,49	0,20705
6	6,7	26,38	4,07	4,37	4,74	0,20605
7	7,1	31,70	4,13	3,47	4,62	0,23579
8	7,7	37,77	4,39	2,37	4,67	0,23528
9	7,8	42,64	4,61	1,85	4,83	0,23342
10	8,1	52,72	4,61	1,16	4,74	0,22553
11	8,8	55,09	4,89	0,265	4,65	0,21658

APÊNDICE B – Tabela dos valores obtidos para concentrações e UI de β -glicosidase e peroxidase ao longo do cultivo de *P. ostreatus* var. *florida* em biorreator *airlift*.

Amostra	β -glicosidase ($\mu\text{mol/L}$)	UI de β -glicosidase/ mL	Peroxidasas (mmol/L)	UI de peroxidasas/ mL
1	5,07	25,35	18,19	10,13
2	5,83	29,14	48,48	26,99
3	16,42	82,11	50,20	27,94
4	19,98	99,89	54,71	30,46
5	26,46	132,32	63,18	35,17
6	28,18	140,91	66,38	36,95
7	28,61	143,03	68,43	38,09
8	28,68	143,41	68,43	38,09
9	28,86	144,32	83,13	46,28
10	30,92	154,59	83,36	46,40
11	31,14	155,68	86,19	47,98